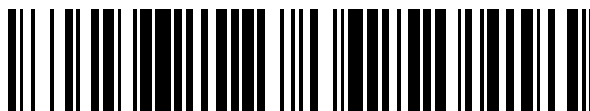


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 375 724**

51 Int. Cl.:  
**A01N 1/02** (2006.01)  
**C12M 1/00** (2006.01)  
**C12M 1/34** (2006.01)  
**C12M 3/00** (2006.01)  
**C12N 5/00** (2006.01)  
**C12N 5/07** (2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **03798803 .7**  
96 Fecha de presentación: **29.09.2003**  
97 Número de publicación de la solicitud: **1569510**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **07.09.2005**

54 Título: **DISPOSITIVO MICROFLUÍDICO PARA SEPERACIÓN DE CÉLULAS Y SUS USOS.**

30 Prioridad:  
27.09.2002 US 414065 P  
27.09.2002 US 414258 P  
27.09.2002 US 414102 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**05.03.2012**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**05.03.2012**

73 Titular/es:  
**THE GENERAL HOSPITAL CORPORATION  
55 FRUIT STREET  
BOSTON, MA 02114, US**

72 Inventor/es:  
**TONER, Mehmet;  
TRUSKEY, George y  
KAPUR, Ravi**

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 375 724 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Dispositivo microfluídico para separación de células y sus usos

**Antecedentes de la invención**

La invención se refiere a los campos del diagnóstico médico y los microfluidos.

5 Existen varios enfoques diseñados para separar una población de células homogéneas de la sangre. Estas técnicas de separación de células pueden agruparse en dos amplias categorías: (1) procedimientos invasivos basados en la selección de células fijadas y teñidas usando diversos marcadores específicos de célula; y (2) procedimientos no invasivos para el aislamiento de células vivas usando un parámetro biofísico específico de una población de células de interés.

10 Las técnicas invasivas incluyen separación de células activadas por fluorescencia (FACS), separación de células activadas magnéticamente (MACS) y separación de coloides inmunomagnética. Normalmente, la FACS es una técnica de selección positiva que usa un marcador marcado de manera fluorescente para unirse a células que expresan un marcador de superficie celular específico. La FACS también puede usarse para permeabilizar y teñir células para marcadores intracelulares que pueden constituir la base de la separación. Es rápida, normalmente  
15 funciona a una velocidad de 1.000 a 1.500 Hz y está bien establecida en la medicina de laboratorio. Se asocian índices elevados de falsos positivos con la FACS por el bajo número de fotones obtenido durante los tiempos de permanencia extremadamente cortos a altas velocidades. Pueden usarse complicados enfoques de separación multiparamétricos para potenciar la especificidad de la FACS, pero la FACS a base de múltiples analitos puede no ser práctica para los ensayos clínicos rutinarios debido al alto coste asociado a ella. La aplicación clínica de FACS  
20 está limitada además porque requiere una pericia del operador considerable, es laboriosa, da como resultado pérdida de células debido a las múltiples manipulaciones y el coste del equipo es prohibitivo.

La MACS se usa como técnica de separación de células en la que las células que expresan un marcador de superficie específico se aíslan a partir de una muestra de células usando perlas magnéticas recubiertas con un anticuerpo contra el marcador de superficie. La MACS tiene la ventaja de ser más barata, más fácil y más rápida de  
25 realizar comparada con la FACS. Se ve afectada por pérdida de células debido a las múltiples manipulaciones y el manejo. Además, a menudo las perlas magnéticas son autofluorescentes y no se separan fácilmente de las células. Como resultado, muchas de las técnicas de inmunofluorescencia usadas para investigar las funciones y la estructura celular no son compatibles con este enfoque.

Se ha usado un sistema de coloides magnético en el aislamiento de células de sangre. Este sistema de coloides usa  
30 nanopartículas ferromagnéticas que están recubiertas con IgG de cabra anti-ratón que puede unirse fácilmente a anticuerpos monoclonales específicos de antígeno de la superficie celular. Las células que están marcadas con nanopartículas ferromagnéticas se alinean con un campo magnético a lo largo de líneas de Ni ferromagnéticas depositadas mediante técnicas litográficas sobre una superficie ópticamente transparente. Este enfoque también requiere múltiples etapas de manejo de células que incluyen mezclar células con perlas magnéticas y separación  
35 sobre las superficies. Tampoco es posible separar las células individuales de la muestra para análisis adicional.

Las técnicas no invasivas incluyen la separación por flujo de carga, que emplea un gradiente líquido de flujo cruzado horizontal opuesto a un campo eléctrico con el fin de separar células en función de sus densidades de carga de superficie características. A pesar de que este enfoque puede separar células basándose puramente en diferencias biofísicas, no es lo suficientemente específico. Ha habido intentos de modificar las características del dispositivo (p.  
40 ej., pantallas del separador, condiciones del flujo a contracorriente de tampón, etc.) para tratar este gran inconveniente de la técnica. Ninguna de estas modificaciones de características del dispositivo ha proporcionado una solución práctica dada la variabilidad individual esperada en muestras diferentes.

Dado que los procedimientos de la técnica anterior se ven afectados por un alto coste, bajo rendimiento y falta de especificidad, existe una necesidad de un procedimiento para retirar un tipo de célula concreto de una mezcla que  
45 supere estas limitaciones.

El documento US 5.866.345 divulga un dispositivo para detectar la presencia de un analito en una muestra líquida, comprendiendo el dispositivo: un sustrato sólido microfabricado para que defina: un puerto de entrada de muestra; un sistema de flujo en mesoescala que comprende: un canal de flujo de muestra en comunicación fluida con dicho puerto de entrada; y una región de detección de analito en comunicación fluida con dicho canal de flujo que  
50 comprende un resto de unión inmovilizado en él para unir dicho analito específicamente, teniendo dicha región de detección una dimensión en mesoescala; y una ventana de detección dispuesta en dicha región de detección para transmitir una señal que indica la unión de dicho analito a un medio de detección dispuesto adyacente a dicha ventana.

El documento US 2002/0115201 A1 divulga un dispositivo microfluídico que comprende: un circuito integrado monolítico de microondas (MMIC) dentro de dicho dispositivo microfluídico para aplicar radiación de microondas a una cavidad definida por dicho dispositivo microfluídico.  
55

5 El documento US 6.613.525 B2 divulga un dispositivo microfluídico integrado que tiene al menos un microcanal formado en un sustrato generalmente plano, comprendiendo dicho dispositivo: al menos un microcanal que comprende una porción de canal de enriquecimiento que tiene al menos una entrada y una salida; y un medio de enriquecimiento presente en dicha porción de canal de enriquecimiento y que contiene restos de unión específica que se unen a un objetivo de una muestra de forma que al menos una fracción del objetivo es retenido por dicho medio de enriquecimiento; dicha porción de canal de enriquecimiento está configurada para (i) recibir, a través de dicha entrada, la muestra que contiene el objetivo y (ii) permitir el movimiento de al menos una parte del objetivo unido a través de dicha salida.

10 Los documentos US 6.344.326 B1 y US 6.074.827 se refieren respectivamente a un procedimiento microfluídico para purificación y procesamiento de ácidos nucleicos. Pueden usarse en el procedimiento microcanales o receptores de captura por afinidad dispuestos en una zona de enriquecimiento.

### **Sumario de la invención**

De acuerdo con un aspecto, se proporciona un dispositivo microfluídico, el cual comprende:

15 (a) una primera región de obstáculos fijos dispuestos en un canal microfluídico que define una vía de flujo de líquido, en el que los obstáculos de la primera región se unen preferentemente a un primer tipo de célula comparado con un segundo tipo de célula, en el que los obstáculos están colocados en al menos dos columnas y al menos dos filas, en el que las filas están colocadas perpendiculares a la vía de flujo de líquido en relación con los obstáculos de la fila anterior, formando de este modo un conjunto de obstáculos triangular equilátero; y

20 (b) una segunda región de obstáculos fijos dispuestos en el canal microfluídico, en el que los obstáculos de la segunda región se unen preferentemente a un tercer tipo de célula comparado con un cuarto tipo de célula, en el que los obstáculos están colocados en al menos dos columnas y al menos dos filas, en el que las filas están colocadas perpendiculares a la vía de flujo de líquido y los obstáculos de cada fila sucesiva están desplazados en una dirección perpendicular a la vía de flujo de líquido en relación con los obstáculos de la fila anterior, formando de este modo un conjunto de obstáculos triangular equilátero,

25 en el que la segunda región está situada más allá de la primera región en el canal microfluídico.

De acuerdo con otro aspecto, se proporciona un uso del dispositivo como se indica en la reivindicación independiente. Las reivindicaciones dependientes definen realizaciones.

El dispositivo puede usarse en procedimientos para separar células de una muestra (p. ej., separar glóbulos rojos fetales de sangre materna).

30 El procedimiento empieza con la introducción de una muestra que incluye células en uno o más canales microfluídicos. En una realización, el dispositivo incluye al menos dos etapas de procesamiento. Por ejemplo, se introduce una mezcla de células en un canal microfluídico que permite selectivamente el paso de un tipo de célula deseado y la población de células enriquecida en el tipo deseado se introduce después en un segundo canal microfluídico que permite el paso de la célula deseada para producir una población de células más enriquecida en el tipo deseado. La selección de células se basa en una propiedad de las células de la mezcla, por ejemplo, tamaño, forma, deformabilidad, características de superficie (p. ej., receptores o antígenos de superficie celular y permeabilidad de membrana) o propiedades intracelulares (p. ej., expresión de una enzima concreta).

35 En la práctica, el procedimiento puede continuar después a través de una variedad de etapas de procesamiento empleando diversos dispositivos. En una etapa, la muestra se combina en los canales microfluídicos con una solución que preferentemente lisa un tipo de célula en comparación con otro tipo. En otra etapa, las células se ponen en contacto con un dispositivo que contiene obstáculos en un canal microfluídico. Los obstáculos unen preferentemente un tipo de célula en comparación con otro tipo. Las células también pueden someterse a separaciones basadas en el tamaño, deformabilidad o forma. Los procedimientos de la invención pueden emplear sólo una de las etapas anteriores o cualquier combinación de las etapas, en cualquier orden, para separar las células. 40 De forma deseable, los procedimientos de la invención recuperan al menos el 75 %, 80 %, 90 %, 95 %, 98 % o 99 % de las células deseadas de la muestra.

45 De acuerdo con una realización, se proporciona un sistema microfluídico para la separación de una célula deseada de una muestra. Este sistema puede incluir dispositivos para llevar a cabo una o cualquier combinación de las etapas de los procedimientos descritos anteriormente. Uno de estos dispositivos es un dispositivo de lisis que incluye al menos dos canales de entrada; una cámara de reacción (p. ej., un canal de serpentina); y un canal de salida. El dispositivo puede incluir adicionalmente otra entrada y una cámara de dilución (p. ej., un canal de serpentina). El dispositivo de lisis está colocado de forma que al menos dos canales de entrada están conectados con la salida a través de la cámara de reacción. Cuando está presente una cámara de dilución, está dispuesta entre la cámara de reacción y la salida y otra entrada está dispuesta entre la cámara de reacción y la de dilución. El sistema también puede incluir un dispositivo de empobrecimiento de células que contiene obstáculos que unen preferentemente un tipo de célula en comparación con otro tipo, p. ej., están recubiertos con anticuerpos anti-CD405, anti-CD35, anti-GPA o anti-CD71. El sistema también puede incluir un dispositivo de selección que contiene un conjunto 50 55

- 5 bidimensional de ubicaciones para contener células individuales. El dispositivo de selección también puede contener accionadores para la manipulación selectiva (p. ej., liberación) de células individuales del conjunto. Finalmente, el sistema puede incluir un dispositivo para la separación de las células basada en el tamaño. Este dispositivo incluye tamices que sólo permiten el paso de células por debajo de un tamaño deseado. Los tamices se ubican con un canal microfluídico a través del cual pasa una suspensión de células, como se describe en el presente documento. Cuando se usan en combinación, los dispositivos del sistema pueden estar en comunicación líquida entre sí. Alternativamente, las muestras que pasan a través de un dispositivo pueden recogerse y transferirse a otro dispositivo.
- 10 Por una "población celular empobrecida" se quiere decir una población de células que se ha procesado para reducir la población relativa de un tipo celular especificado en una mezcla de células. En consecuencia, recoger esas células retiradas de la mezcla también conduce a una muestra enriquecida en las células retiradas.
- Por una "población celular enriquecida" se quiere decir una población de células que se ha procesado para incrementar la población relativa de un tipo celular especificado en una mezcla de células.
- 15 Por "tampón de lisis" se quiere decir un tampón que, cuando se pone contacto con una población de células, provocará la lisis de al menos un tipo de célula.
- Por "provocar la lisis" se quiere decir que lisa al menos el 90 % de las células de un tipo concreto.
- Por "no lisado" se quiere decir que se lisan menos del 10 % de células de un tipo concreto. De forma deseable, se lisan menos del 5 %, 2 % o 1 % de estas células.
- 20 Por "tipo" de célula se quiere decir una población de células que tienen una propiedad común, p. ej., la presencia de un antígeno de superficie concreto. Una sola célula puede pertenecer a varios tipos de células diferentes.
- Por "canal de serpentina" se quiere decir un canal que tiene una longitud total que es más grande que la distancia lineal entre los puntos de los extremos del canal. Un canal de serpentina puede orientarse totalmente verticalmente u horizontalmente. Alternativamente, un canal de serpentina puede estar en "3D," p. ej., partes del canal están orientadas verticalmente y partes están orientadas horizontalmente.
- 25 Por "microfluídico" se quiere decir que tiene una o más dimensiones de menos de 1 mm.
- Por "resto de unión" se quiere decir una especie química a la que se une una célula. Un resto de unión puede ser un compuesto acoplado a una superficie o el material que constituye la superficie. Los restos de unión ejemplares incluyen anticuerpos, oligo- o polipéptidos, ácidos nucleicos, otras proteínas, polímeros sintéticos y carbohidratos.
- Por "obstáculo" se quiere decir un impedimento para el flujo en un canal, p. ej., una protrusión de una superficie.
- 30 Por "que une específicamente" un tipo de célula se quiere decir que une células de ese tipo mediante un mecanismo especificado, p. ej., interacción anticuerpo-antígeno. La fuerza de la unión generalmente es suficiente para evitar el desprendimiento por el flujo de líquido presente cuando las células están unidas, aunque ocasionalmente pueden desprenderse células individuales bajo condiciones de funcionamiento normales.
- 35 Por "filas de obstáculos" se quiere decir una serie de obstáculos colocados de forma que los centros de los obstáculos están colocados de forma sustancialmente lineal. La distancia entre filas es la distancia entre las líneas de dos filas adyacentes en las que se ubican los centros.
- Por "columnas de obstáculos" se quiere decir una serie de obstáculos colocados perpendiculares a una fila de forma que los centros de los obstáculos están colocados de forma sustancialmente lineal. La distancia entre columnas es la distancia entre las líneas de dos columnas adyacentes en las que se ubican los centros.
- 40 Los procedimientos son capaces de separar poblaciones de células específicas de una mezcla compleja sin fijarlas y/o teñirlas. Como resultado de obtener poblaciones de células homogéneas vivas, pueden realizarse muchos ensayos funcionales en las células. Los dispositivos microfluídicos descritos en el presente documento proporcionan un enfoque selectivo, simple, para procesar células. Otras características y ventajas de la invención serán aparentes a partir de la siguiente descripción y las reivindicaciones.
- 45 **Breve descripción de los dibujos**
- La Figura 1 es un diseño esquemático de un dispositivo microfluídico que permite la lisis selectiva de células.
- La Figura 2 es una ilustración del diseño del canal para la introducción de tres líquidos en el dispositivo, p. ej., muestra de sangre, tampón de lisis y diluyente.
- 50 La Figura 3 es una ilustración de una unidad de repetición de la cámara de reacción del dispositivo donde una muestra de células se mezcla de forma pasiva con un tampón de lisis. En un ejemplo, se conectan 133 unidades para formar la cámara de reacción.

La Figura 4 es una ilustración de los canales de salida del dispositivo.

La Figura 5 es una ilustración de un dispositivo para lisis celular.

Las Figuras 6A y 6B son ilustraciones de un procedimiento para la fabricación de un dispositivo de la invención.

La Figura 7 es un diagrama esquemático de un dispositivo de unión de células.

5 La Figura 8 es una vista en despiece de un dispositivo de unión de células.

La Figura 9 es un ilustración de los obstáculos de un dispositivo de unión de células.

La Figura 10 es una ilustración de tipos de obstáculos.

10 La Figura 11A es una representación esquemática de un conjunto cuadrado de obstáculos. El conjunto cuadrado tiene una eficacia de captura del 40 %. La Figura 11B es una representación esquemática de un conjunto triangular equilátero de obstáculos. El conjunto triangular equilátero tiene una eficacia de captura del 56 %.

La Figura 12A es una representación esquemática del cálculo de la eficacia hidrodinámica para un conjunto cuadrado. La Figura 12B es una representación esquemática del cálculo de la eficacia hidrodinámica para una matriz diagonal.

15 La Figuras 13A-13B son gráficas de la eficacia hidrodinámica (13A) y global (13B) para un conjunto cuadrado y triangular para una caída de presión de 150 Pa/m. Esta caída de presión corresponde a un caudal de 0,75 ml/h en la geometría plana.

La Figura 14A es una gráfica de la eficacia global como función de la caída de presión. La Figura 14B es una gráfica del efecto de la separación de los obstáculos en la velocidad media.

20 La Figura 15 es una representación esquemática de la colocación de obstáculos para una eficacia de captura más alta para un conjunto triangular equilátero de obstáculos en un conjunto escalonado. El radio de captura es  $r_{cap2} = 0,339/$ . Los obstáculos están numerados de forma que el primer número se refiere al número de triángulo y el segundo número se refiere al vértice del triángulo. El conjunto escalonado tiene una eficacia de captura del 98 %.

25 La Figura 16A es una gráfica del porcentaje de captura de células como función del caudal para una geometría de obstáculo de 100  $\mu\text{m}$  de diámetro con un espaciado de 50  $\mu\text{m}$  entre sus bordes. El régimen de flujo de funcionamiento se estableció a través de varios tipos celulares: células cancerosas, células de tejido conectivo normales y muestras maternas y fetales. Un régimen de flujo de trabajo óptimo es a 2,5 ml/h. La Figura 16B es una gráfica del porcentaje de captura de células como función de la relación de células objetivo y glóbulos blancos. El sistema modelo se generó añadiendo un número definido de células cancerosas, células de tejido conectivo normales o células de sangre de cordón umbilical en un número definido de células de capa leucocítica de sangre adulta. La relación de las células contaminantes y células objetivo se incrementó gradualmente en 5 log con tan sólo 10 células objetivo en la mezcla. El rendimiento se calculó como la diferencia entre el número de células añadidas capturadas en puestos y el número de células añadidas a la muestra.

30 La Figura 17 es una ilustración de diversas vistas de la entrada y las salidas de un dispositivo de unión de células.

La Figura 18 es un ilustración de un procedimiento de fabricación de un dispositivo de unión de células.

La Figura 19 es un ilustración de una mezcla de células que fluye a través de un dispositivo de unión de células.

35 La Figura 20A es una ilustración de un dispositivo de unión de células para atrapar tipos de células diferentes en serie. La Figura 20B es una ilustración de un dispositivo de unión de células para atrapar tipos de células diferentes en paralelo.

La Figura 21 es una ilustración de un dispositivo de unión de células que permite la recuperación de células unidas.

40 La Figura 22A es una micrografía óptica de glóbulos rojos fetales adheridos a un obstáculo de la invención. La Figura 22B es una micrografía fluorescente que muestra los resultados de un análisis FISH de un glóbulo rojo fetal unido a un obstáculo de la invención. La Figura 22C es una micrografía ampliada de la Figura 22B que muestra los resultados de hibridación individuales para el glóbulo rojo fetal.

La Figura 23 es una ilustración de un dispositivo de unión de células en el que se usan perlas atrapadas en un hidrogel para capturar células.

La Figura 24A es una ilustración de un dispositivo para separación basada en el tamaño.

La Figura 24B es una micrografía electrónica de un dispositivo para separación basada en el tamaño.

La Figura 25 es una representación esquemática de un dispositivo de la invención para aislar y analizar glóbulos rojos fetales.

Las figuras no están necesariamente a escala.

5 **Descripción detallada de la invención**

La invención presenta dispositivos para uso en procedimientos para separar una célula deseada de una mezcla o enriquecer la población de una célula deseada en una mezcla. Los procedimientos se basan generalmente en etapas de procesamiento secuenciales, cada una de las cuales reduce el número de células no deseadas en la mezcla, pero puede usarse una etapa de procesamiento en los procedimientos. Los dispositivos para llevar a cabo diversas etapas de procesamiento pueden estar separados o integrados en un sistema microfluídico. Los dispositivos de la invención incluyen un dispositivo para unión de células. En una realización, se usan etapas de procesamiento para reducir el número de células antes de seleccionarlas. De forma deseable, los procedimientos retienen al menos el 75 %, 80 %, 90 %, 95 %, 98 % o 99 % de las células en comparación con la mezcla inicial, mientras que enriquecen potencialmente la población de células deseadas en un factor de al menos 100, 1000, 10.000, 100.000 o incluso 1.000.000 con relación a uno o más tipos celulares no deseados. Los procedimientos pueden usarse para separar o enriquecer células que circulan en la sangre (Tabla 1).

Tabla 1: Tipos, concentraciones y tamaños de células sanguíneas.

Tipo celular	Concentración (células/ $\mu$ l)	Tamaño ( $\mu$ m)
Glóbulos rojos (GR)	$4,2-6,1 \times 10^6$	4-6
Neutrófilos segmentados (GB)	3600	> 10
Neutrófilos en banda (GB)	120	> 10
Linfocitos (GB)	1500	> 10
Monocitos (GB)	480	> 10
Eosinófilos (GB)	180	>10
Basófilos (GB)	120	> 10
Plaquetas	$500 \times 10^{-3}$	1-2
Glóbulos rojos nucleados fetales	$2 - 50 \times 10^{-3}$	8-12

**Dispositivos**

20 **A. Lisis celular**

Se emplea un dispositivo para lisar una población de células selectivamente, p. ej., glóbulos rojos maternos, en una mezcla de células, p. ej., sangre materna. Este dispositivo permite el procesamiento de grandes cantidades de células bajo condiciones casi idénticas. De forma deseable, el dispositivo de lisis retira un gran número de células antes del procesamiento adicional. Los desechos, p. ej., membranas celulares y proteínas, pueden atraparse, p. ej., por filtración o precipitación, antes de cualquier procesamiento adicional.

25 **Dispositivo.** En la Figura 1 se muestra un diseño para un dispositivo de lisis. La arquitectura ramificada global de los canales del dispositivo permite caídas de presión equivalentes a lo largo de las redes de procesamiento paralelas. El dispositivo puede estar separado funcionalmente en cuatro secciones distintas: 1) canales de entrada distribuidos que llevan líquidos, p. ej., sangre, reactivo de lisis y tampón de lavado, a las uniones 1 y 2 (Figura 2); 2) una cámara de reacción de serpentina para la reacción de lisis celular que se aloja entre las dos uniones (Figura 3); 3) una cámara de dilución más allá de la Unión 2 para la dilución del reactivo de lisis (Figura 3); y 4) canales de salida distribuidos que llevan la muestra lisada a un vial de recogida o a otro dispositivo microfluídico (Figura 4).

30 **Canales de entrada/salida.** Las redes ramificadas de entrada y salida de los canales permiten la distribución uniforme de los reactivos en todos los canales (8, como se representa en la Figura 1). Los tres puertos para conectar el mundo macro con el dispositivo normalmente tienen un diámetro que varía entre 1 mm - 10 mm, p. ej., 2, 5, 6 u 8 mm. Pueden formarse cierres herméticos con los puertos 1, 2 y 3, p. ej., a través de un colector externo integrado con el dispositivo (Figura 1). Los tres viales de solución, p. ej., sangre, reactivo de lisis y diluyente, pueden conectarse con un colector tal. Los canales de entrada de los puertos 1, 2 y 3 a las cámaras de reacción y mezclado, para las tres soluciones mostradas en la Figura 1, pueden estar separadas en el plano z del dispositivo (tres capas, cada una con un juego de canales de distribución, véase la Figura 2) o alojarse en el colector externo. Si se alojan

en el colector externo, los canales de distribución están, por ejemplo, CNC (controlados numéricamente por ordenador), maquinados en acero inoxidable y pueden tener dimensiones de 500  $\mu\text{m}$  de diámetro. El colector puede conectarse herméticamente con el dispositivo en puertos que están grabados en las ubicaciones 1', 2' y 3' mostradas en la Figura 1. Ubicar los canales de distribución en un colector reduce la complejidad y el coste del dispositivo.

5 Mantener los canales de distribución en el dispositivo permitirá una mayor flexibilidad para seleccionar un tamaño de canal más pequeño, mientras que evita cualquier problema de contaminación por transferencia entre muestras. Cada canal de entrada de muestra puede tener una salida separada o, como se representa en la Figura 4, los canales de salida para cada entrada de muestra están combinados. Como alternativa a un colector, pueden unirse al dispositivo tubos para cada entrada o salida de líquido, p. ej., mediante ajuste por compresión a juntas o boquillas o usando conexiones herméticas al agua tales como un cierre luer. Los canales del dispositivo que llevan los líquidos a las uniones y cámaras de mezclado posteriores, pueden tener una anchura y una profundidad que varían desde 10  $\mu\text{m}$  - 500  $\mu\text{m}$ , p. ej., como máximo una anchura y profundidad de 10  $\mu\text{m}$ , 25  $\mu\text{m}$ , 50  $\mu\text{m}$ , 75  $\mu\text{m}$ , 100  $\mu\text{m}$ , 150  $\mu\text{m}$ , 200  $\mu\text{m}$ , 250  $\mu\text{m}$ , 350  $\mu\text{m}$  o 450  $\mu\text{m}$ . De forma deseable, la arquitectura del canal es rectangular pero también puede ser circular, semicircular, con forma de V o cualquiera otra forma apropiada. En una implementación, el canal (o canales) de salida tiene un área de sección transversal igual a la suma de las áreas de sección transversal de los canales de entrada.

**Cámaras de reacción y dilución.** Para la lisis y dilución, se combinan dos corrientes líquidas y se dejan pasar a través de las cámaras. Las cámaras pueden ser canales de serpentina o lineales. En el dispositivo representado en la Figura 1, la muestra y el tampón de lisis se combinan en la unión 1 y la muestra lisada y el diluyente se combinan en la unión 2. La arquitectura de serpentina de la cámara de reacción y la cámara de dilución permite un tiempo de residencia suficiente de las dos soluciones reactivas para un mezclado apropiado por difusión u otros mecanismos pasivos, mientras mantiene un tamaño global razonable para el dispositivo (Figura 3). Los canales de serpentina pueden construirse en 2D o en 3D, p. ej., para reducir la longitud total del dispositivo o para introducir advección caótica para un mezclado potenciado. Para tiempos de residencia cortos, puede desearse una cámara lineal. Los tiempos de residencia ejemplares incluyen al menos 1segundo, 5 segundos, 10 segundos, 30 segundos, 60 segundos, 90 segundos, 2 minutos, 5 minutos, 30 minutos, 1 hora o mayores de 1 hora. El caudal de los líquidos de las cámaras de reacción/dilución puede controlarse con precisión controlando la anchura, profundidad y longitud eficaz de los canales para permitir un mezclado suficiente de los dos reactivos mientras a la vez que se permite un rendimiento del procesamiento óptimo. En una implementación, las cámaras de mezclado de serpentina para lisis celular (cámara de reacción) y para dilución de la muestra lisada (cámara de dilución) tienen un volumen de líquido de 26  $\mu\text{l}$  cada una. Otros ejemplos de volúmenes de la cámara de reacción/dilución varían desde 10 - 200  $\mu\text{l}$ , p. ej., como máximo 20, 50, 100 o 150  $\mu\text{l}$ . En algunas implementaciones, la anchura y profundidad de las cámaras de reacción y dilución tienen el mismo intervalo que los canales de entrada y salida, es decir, 10 a 500  $\mu\text{m}$ . Alternativamente, las cámaras pueden tener un área de sección transversal igual a la áreas combinadas de todos los canales de entrada (o de salida) con el fin de garantizar una velocidad de flujo uniforme a través del dispositivo. En un ejemplo, las cámaras son canales de 100  $\mu\text{m}$  x 100  $\mu\text{m}$ . La longitud total de las cámaras puede ser de al menos 1 cm, 5 cm, 10 cm, 20 cm, 30 cm, 40 cm o 50 cm.

Para lisis de GR maternos, los caudales de salida del dispositivo pueden variar desde procesar 5 - 16  $\mu\text{l}$  de sangre por segundo dando como resultado un tiempo de procesamiento de 20 - 60 minutos para muestras de 20 ml o un tiempo de procesamiento de 10 - 30 min para muestras de 10 ml. Se espera que el volumen de muestra requerido para capturar un número suficiente de células fetales sea menor de 10 ml debido a la eficacia del procedimiento. Así, se espera que el rendimiento del dispositivo por muestra sea inferior a 10 minutos. Un tiempo de residencia de > 30 segundos a partir del momento de convergencia de las dos soluciones, sangre materna y reactivo de lisis, dentro del mezclador pasivo se considera suficiente para obtener una hemólisis eficaz (T. Maren, Mol. Pharmacol. 1970, 6:430). Alternativamente, la concentración de reactivo de lisis puede ajustarse para compensar el tiempo de residencia en la cámara de reacción. Los caudales y los tiempos de residencia para otros tipos celulares pueden determinarse teóricamente o por experimentación. En una implementación, los caudales en cada canal están limitados a < 20  $\mu\text{l/s}$  para garantizar que el esfuerzo de cizalladura de las paredes sobre las células sea menor de 1 dina/cm<sup>2</sup> (se sabe que un esfuerzo de cizalladura > 1 dina/cm<sup>2</sup> afecta a las células funcionalmente, aunque no se observan efectos nocivos en la mayoría de las células hasta superar las 10 dinas/cm<sup>2</sup>). En una implementación, el caudal en cada canal es como máximo de 1, 2, 5, 10, 15  $\mu\text{l/s}$ . En referencia a la Figura 1, la longitud eficaz del canal de entrada del diluyente que lleva a la unión 2 puede ser más corta que la longitud eficaz de la cámara de reacción. Esta característica permite que el diluyente fluya hacia y alimente los canales posteriores a la unión 2, antes de la llegada de la muestra lisada a la unión 2. El tampón excedente recogido previamente en el vial de salida puede actuar como un diluyente secundario de la muestra lisada cuando se recoge, por ejemplo, para procesamiento o análisis adicional. Adicionalmente, el diluyente alimenta los canales posteriores a la unión 2 para permitir un flujo más suave y la fusión de la muestra lisada con el tampón en la cámara de dilución, y esta alimentación elimina cualquier efecto de tensión superficial nocivo de canales secos en la muestra lisada. El diámetro de los canales que llevan el diluyente puede ajustarse para permitir que el diluyente alcance la unión 2 al mismo tiempo que la sangre lisada para evitar cualquier problema asociado con aire forzado desde la cámara de reacción a medida que se introducen la muestra y los tampones de lisis.

Aunque la descripción anterior se centra en un dispositivo con ocho canales de procesamiento paralelos, puede emplearse cualquier número de canales, p. ej., 1, 2, 4, 16 o 32, dependiendo del tamaño del dispositivo. El

dispositivo se describe en términos de combinar dos líquidos para lisis y dilución, pero pueden combinarse tres o más líquidos para lisis o dilución. La combinación puede ser en una unión o una serie de uniones, p. ej., para controlar el ritmo de la adición secuencial de los reactivos. Pueden añadirse entradas de líquido adicionales, p. ej., para funcionalizar las células restantes, alterar el pH o provocar la precipitación de componentes no deseables. Además, la geometría y dimensiones exactas de los canales pueden alterarse (se muestran dimensiones ejemplares en la Figura 5). Los dispositivos de la invención pueden ser desechables o reutilizables. Los dispositivos desechables reducen el riesgo de contaminación entre muestras. Los dispositivos reutilizables pueden ser desechables en algunos casos y el dispositivo puede limpiarse, p. ej., con diversos detergentes y enzimas, p. ej., proteasas o nucleasas, para evitar la contaminación.

5 **Bombeo.** En una implementación, el dispositivo emplea bombeo de presión negativa, p. ej., usando bombas de jeringa, bombas peristálticas, aspiradores o bombas de vacío. La presión negativa permite el procesamiento del volumen total de una muestra de sangre clínica, sin dejar muestra sin procesar en los canales. También puede usarse presión positiva, p. ej., de una bomba de jeringa, bomba peristáltica, bomba de desplazamiento, columna de líquido u otra bomba de líquido, para bombear muestras a través de un dispositivo. La pérdida de muestra debida a problemas de volumen muerto relacionados con bombeo de presión positiva puede superarse expulsando la muestra residual con tampón. Las bombas están conectadas normalmente al dispositivo a través de cierres herméticos, p. ej., usando juntas de silicona.

10 Los caudales de líquidos de canales paralelos del dispositivo pueden controlarse conjuntamente o por separado. Puede lograrse el control variable y diferencial de los caudales de cada canal, por ejemplo, empleando un colector de jeringa multicanal controlable individualmente. En esta implementación, la distribución del canal de entrada se modificará para que se desacople de todas las redes paralelas. La salida puede recoger la salida de todos los canales a través de un sólo colector conectado a una succión (no se requiere un cierre hermético) que tiene salida a un vial de recogida o a otro dispositivo microfluídico. Alternativamente, la salida de cada red puede recogerse por separado para procesamiento posterior. Las entradas y salidas separadas permiten el procesamiento paralelo de múltiples muestras de uno o más individuos.

15 **Fabricación.** Puede emplearse una variedad de técnicas para fabricar un dispositivo y la técnica empleada se seleccionará basándose en parte en el material elegido. Los materiales ejemplares para fabricar los dispositivos de la invención incluyen vidrio, silicio, acero, níquel, poli(metilmacrilato) (PMMA), policarbonato, poliestireno, polietileno, poliolefinas, siliconas (p. ej., poli(dimetilsiloxano)) y sus combinaciones. Se conocen otros materiales en la técnica. Se conocen en la técnica procedimientos para fabricar canales de estos materiales. Estos procedimientos incluyen, fotolitografía (p. ej., estereolitografía o fotolitografía de rayos x), moldeo, repujado, micromaquinado de silicio, grabado químico húmedo o seco, molienda, corte con diamante, Lithographie Galvanoformung y Abformung (LIGA) y galvanoplastia. Por ejemplo, para el vidrio, pueden emplearse las técnicas de fabricación con silicio tradicionales de fotolitografía seguidas de grabado húmedo (KOH) o seco (grabado por ion reactivo con flúor u otro gas reactivo). Pueden adoptarse técnicas como micromaquinado con láser para materiales plásticos con eficacia de absorción de fotones alta. Esta técnica es adecuada para fabricación de rendimiento más bajo debido a la naturaleza serial del procedimiento. Para dispositivos plásticos producidos en serie, son adecuados el moldeo por inyección termoplástico y el moldeo por compresión. El moldeo por inyección termoplástico convencional usado para la fabricación en serie de discos compactos (que mantiene la fidelidad de las características en submicras) también puede emplearse para fabricar los dispositivos. Por ejemplo, las características del dispositivo se duplican en un patrón de vidrio por litografía convencional. El patrón de vidrio se electroforma para proporcionar un molde resistente, resistente a choque térmico, termoconductor y duro. Este molde sirve como la plantilla patrón para el moldeo por inyección o el moldeo por compresión de las características en un dispositivo de plástico. Dependiendo del material plástico usado para fabricar los dispositivos y de los requisitos de calidad óptica y rendimiento de producto acabado, puede escogerse moldeo por compresión o moldeo por inyección como procedimiento de fabricación. El moldeo por compresión (también llamado repujado en caliente o impresión en relieve) tiene las ventajas de ser compatible con polímeros de peso molecular alto, que son excelentes para estructuras pequeñas, pero es difícil de usar para duplicar estructuras con alta relación de aspecto y tiene ciclos de duración más larga. El moldeo por inyección funciona bien para estructuras de alta relación de aspecto, pero es más adecuado para polímeros de bajo peso molecular.

20 Un dispositivo puede fabricarse en una o más piezas que se montan después. En una realización, las capas separadas del dispositivo contienen canales para un sólo fluido, como en la Figura 1. Las capas de un dispositivo pueden estar unidas juntas con pinzas, adhesivos, calor, unión anódica o reacciones entre grupos de superficie (p. ej., unión de obleas). Alternativamente, un dispositivo con canales en más de un plano puede fabricarse como una sola pieza sola, p. ej., usando estereolitografía u otras técnicas de fabricación tridimensionales.

25 En una implementación, el dispositivo está hecho de PMMA. Las características, por ejemplo, las que se muestran en la Figura 1, se transfieren a un molde electroformado usando fotolitografía estándar seguida de galvanoplastia. El molde se usa para repujar en caliente las características en el PMMA a una temperatura cercana a su temperatura de transición vítrea (105 °C) bajo presión (5 a 20 toneladas) (la presión y la temperatura se ajustarán para que permitan la duplicación de alta fidelidad de la característica más profunda del dispositivo) como se muestra en la Figura 6A. Después, se enfría el molde para permitir la retirada del dispositivo de PMMA. Una segunda pieza usada para cerrar el dispositivo, compuesta de material similar o diferente, puede unirse a la primera pieza usando unión



térmica asistida por vacío. El vacío evita la formación de huecos de aire en las regiones de unión. La Figura 6B muestra una sección transversal del montaje de dispositivo de dos piezas en la unión del Puerto 1 (fuente para muestra de sangre) y el canal de alimentación.

- 5 **Derivatización química.** Para reducir la adsorción no específica de células o compuestos liberados por células lisadas sobre las paredes del canal, una o más paredes de canal pueden modificarse químicamente para que sean no adherentes o repulsivas. Las paredes pueden recubrirse con un recubrimiento de película fina (p. ej., una monocapa) de reactivos no pegajosos comerciales, tales como los usados para formar hidrogeles. Los ejemplos adicionales de especies químicas que pueden usarse para modificar las paredes del canal incluyen oligoetilenglicoles, polímeros fluorados, organosilanos, tioles, polietilenglicol, ácido hialurónico, albúmina de suero bovino, alcohol polivinílico, mucina, poli-HEMA, PEG-metacrilato y agarosa. También pueden emplearse polímeros cargados para repeler especies de carga opuesta. El tipo de especies químicas usado para la repulsión y el procedimiento de unión a la paredes del canal dependerá de la naturaleza de las especies que se repelen y la naturaleza de las paredes y las especies que se unen. Tales técnicas de modificación de la superficie son bien conocidas en la técnica. Las paredes pueden funcionalizarse antes o después del montaje del dispositivo.
- 10
- 15 Las paredes del canal también pueden recubrirse con el fin de capturar materiales de la muestra, p. ej., fragmentos de membrana o proteínas.

- 20 **Procedimientos.** En la presente implementación, se introduce una muestra de células, p. ej., sangre materna, en uno o más canales microfluídicos. Después se mezcla con la muestra de sangre un tampón de lisis que contiene reactivos para la lisis selectiva de una población de células de la muestra. De forma deseable, el mezclado se produce por medios pasivos, p. ej., difusión o advección caótica, pero pueden emplearse medios activos. Se conocen mezcladores pasivos y activos adicionales en la técnica. Se deja continuar la reacción de lisis durante un periodo de tiempo deseado. Este periodo de tiempo puede controlarse, por ejemplo, mediante la longitud de los canales o mediante el caudal de los líquidos. Además, es posible controlar los volúmenes de las soluciones mezcladas en los canales alterando los caudales volumétricos relativos de las soluciones, p. ej., alterando el tamaño del canal o la velocidad de flujo. El flujo puede ralentizarse, incrementarse o detenerse durante cualquier periodo de tiempo deseado. Después de que se haya producido la lisis, puede introducirse un diluyente en el canal con el fin de reducir la concentración de reactivos de lisis y cualquier especie potencialmente dañina (p. ej., enzimas endosómicas) liberada por las células lisadas. El diluyente puede contener especies que neutralizan los reactivos de lisis que alteran el entorno del líquido de otro modo, p. ej., pH o viscosidad, o puede contener reactivos para el marcaje de superficie o intracelular de células. El diluyente también puede reducir la densidad óptica de la solución, lo cual puede ser importante para algunos esquemas de detección, p. ej., medidas de absorbancia.
- 25
- 30

- Los tipos celulares ejemplares que pueden lisarse usando los procedimientos descritos en el presente documento incluyen glóbulos rojos adultos, glóbulos blancos (tales como linfocitos T, linfocitos B y linfocitos T colaboradores), glóbulos blancos infectados, células tumorales y organismos infecciosos (p. ej., bacterias, protozoos y hongos). El tampón de lisis para estas células puede incluir moléculas de IgM específicas de células y proteínas de la cascada del complemento para iniciar la lisis mediada por complemento. Otra clase de tampón de lisis puede incluir virus que infectan un tipo celular específico y provocan la lisis como resultado de la duplicación (véase, p. ej., Pawlik y col. Cancer 2002, 95:1171-81). Se conocen otros tampones de lisis en la técnica.
- 35

- Puede usarse un dispositivo para la lisis selectiva de glóbulos rojos (GR) maternos con el fin de enriquecer una muestra de sangre en células fetales. En este ejemplo, se procesa una muestra de sangre materna, 10-20 ml, dentro de las primeras una a tres horas después la recogida de la muestra. Si el procesamiento se retrasa más allá de las tres horas, la muestra puede almacenarse a 4 °C hasta que se procesa. El dispositivo de lisis permite mezclar el reactivo de lisis ( $\text{NH}_4\text{Cl}$  (0 a 150 mM) +  $\text{NaHCO}_3$  (0,001 a 0,3 mM) + acetazolamida (0,1 a 100  $\mu\text{M}$ )) con la sangre materna para permitir la lisis selectiva de los glóbulos rojos maternos por el principio subyacente de la reacción de Orskov-Jacobs-Stewart (véase, por ejemplo, Boyer y col. Blood 1976, 47:883-897). La alta permeabilidad selectiva del inhibidor de anhidrasa carbónica, acetazolamida, en células fetales permite una hemólisis selectiva de los glóbulos rojos maternos. La anhidrasa carbónica endógena de las células maternas convierte el  $\text{HCO}_3^-$  en dióxido de carbono, que lisa los glóbulos rojos maternos. La enzima está inhibida en los glóbulos rojos fetales y esas células no se lisan. Puede añadirse un diluyente (p. ej., solución salina tamponada con fosfato) después de un periodo de contacto entre los reactivos de lisis y la muestra de células para reducir el riesgo de que una parte de los glóbulos rojos fetales se lise tras una exposición prolongada a los reactivos.
- 40
- 45
- 50

## **B. Unión de células**

- Otro dispositivo de la invención implica la retirada de células completas de una mezcla uniendo las células a las superficies del dispositivo. Las superficies un dispositivo tal, contienen sustancias, p. ej., anticuerpos o ligandos para receptores de superficie celular, que unen una subpoblación de células concreta. Esta etapa del procedimiento puede emplear selección positiva, es decir, las células deseadas se unen al dispositivo, o puede emplear selección negativa, es decir, las células deseadas pasan a través del dispositivo. En ambos casos, la población de células que contiene las células deseadas se recoge para análisis o procesamiento posterior.
- 55

**Dispositivo.** El dispositivo es un sistema de flujo microfluídico que contiene un conjunto de obstáculos de formas diversas que son capaces de unir una población de células, p. ej., aquellas que expresan una molécula de superficie específica, de una mezcla. Las células unidas pueden analizarse directamente en el dispositivo o retirarse del dispositivo, p. ej., para análisis o procesamiento posterior. Alternativamente, pueden recogerse las células no unidas a los obstáculos, p. ej., para análisis o procesamiento posterior.

Un dispositivo ejemplar es un aparato de flujo que tiene un canal de placa plana a través de cual fluyen las células; un dispositivo tal se describe en la patente de EE. UU. N.º 5.837.115. La Figura 7 muestra un sistema ejemplar que incluye una bomba de infusión para perfundir una mezcla de células, p. ej., sangre, a través del dispositivo microfluídico. Pueden emplearse otros procedimientos de bombeo, como se describen en el presente documento. El dispositivo puede ser ópticamente transparente, o tener ventanas transparentes, para visualizar las células durante el flujo a través del dispositivo. El dispositivo contiene obstáculos distribuidos, en un conjunto ordenado, a lo largo de la cámara de flujo. De forma deseable, las superficies superior e inferior del dispositivo son paralelas entre sí. Este concepto se representa en la Figura 8. Los obstáculos pueden ser parte de la superficie inferior o superior y, de forma deseable, definen la altura del canal de flujo. También es posible que una parte de los obstáculos estén situados en la superficie inferior y el resto en la superficie superior. Los obstáculos pueden estar en contacto con ambas superficies, superior e inferior, de la cámara o puede haber un hueco entre un obstáculo y una superficie. Los obstáculos pueden estar recubiertos con un resto de unión, p. ej., un anticuerpo, un polímero cargado, una molécula que une un receptor de superficie de la célula, un oligo- o polipéptido, una proteína vírica o bacteriana, un ácido nucleico o un carbohidrato, que se une a una población de células, p. ej., aquellas que expresan una molécula de superficie específica, de una mezcla. Se conocen en la técnica otros restos de unión que son específicos para un tipo de célula concreto. En una realización alternativa, los obstáculos se fabrican de un material al que se une un tipo de célula específico. Los ejemplos de tales materiales incluyen polímeros orgánicos (cargados o no cargados) y carbohidratos. Una vez que un resto de unión se acopla a los obstáculos, también puede aplicarse un recubrimiento, como se describe en el presente documento, a cualquier superficie expuesta de los obstáculos para evitar la adhesión no específica de células a los obstáculos.

En la Figura 9 se muestra una geometría de obstáculos. En un ejemplo, los obstáculos están grabados en un área de superficie de 2 cm x 7 cm en un sustrato con dimensiones globales de 2,5 cm x 7,5 cm. Se deja un margen de 2 mm alrededor del sustrato para unirlo a la superficie superior para crear una cámara cerrada. En una realización, el diámetro de los obstáculos es 50 µm con una altura de 100 µm. Los obstáculos pueden estar colocados en un conjunto de filas bidimensional con una distancia de 100 µm entre los centros. Esta colocación proporciona aberturas de 50 µm para que las células fluyan entre los obstáculos sin que sean comprimidas mecánicamente o dañadas. De forma deseable, los obstáculos de una fila están desplazados, p. ej., 50 µm con respecto a las filas adyacentes. Este patrón alterno puede repetirse a lo largo del diseño para garantizar una frecuencia de colisión incrementada entre células y obstáculos. El diámetro, la anchura o la longitud de los obstáculos puede ser de al menos 5, 10, 25, 50, 75, 100 o 250 µm y como máximo de 500, 250, 100, 75, 50, 25 o 10 µm. El espaciado entre los obstáculos pueden ser de al menos 10, 25, 50, 75, 100, 250, 500 o 750 µm y como máximo de 1000, 750, 500, 250, 100, 75, 50 o 25 µm. La Tabla 2 enumera espaciados ejemplares basados en el diámetro de los obstáculos.

Tabla 2. Espaciados ejemplares para obstáculos.

Diámetro del obstáculo (µm)	Espaciado entre obstáculos (µm)
100	50
100	25
50	50
50	25
10	25
10	50
10	15

Las dimensiones y la geometría de los obstáculos pueden variar significativamente. Por ejemplo, los obstáculos pueden tener secciones transversales cilíndricas o cuadradas (Figura 10). La distancia entre obstáculos también puede variar y puede ser diferente en la dirección del flujo en comparación con la dirección ortogonal al flujo. En algunas realizaciones, la distancia entre los bordes de los obstáculos es ligeramente más grande que el tamaño de la célula más grande de la mezcla. Esta colocación permite el flujo de células sin que sean comprimidas mecánicamente entre los obstáculos y, por tanto, se dañen durante el proceso de flujo, y también maximiza el número de colisiones entre células y los obstáculos con el fin de aumentar la probabilidad de unión. La dirección de flujo con respecto a la orientación de los obstáculos también puede alterarse para potenciar la interacción de células con obstáculos.

Las colocaciones ejemplares de obstáculos se muestran en las Figuras 11A-11B. Todas estas colocaciones tienen una eficacia de captura calculada. El cálculo de la unión celular consideró dos geometrías diferentes: un conjunto cuadrado (Figura 11A) y un conjunto triangular equilátero (Figura 11B). En general, los resultados se presentan en términos de la eficacia de adhesión. Los cálculos constan de dos partes, calcular la eficacia hidrodinámica y la probabilidad de adhesión. La eficacia hidrodinámica se determinó como la relación del radio de captura y la mitad de la distancia entre los cilindros (Figuras 12A y 12B). Para el conjunto cuadrado,  $\eta = (2r_{cap}/l)*100\%$ , y para otros conjuntos,  $\eta = ((r_{cap1} + r_{cap2})/d_1)*100\%$ , donde  $d_1 = d_2 = l/\sqrt{2}$  para un conjunto cuadrado diagonal, y  $d_1 = l/\sqrt{3}$ ,  $d_2 = l/2$  para un conjunto triangular. La probabilidad de adhesión representa la fracción de células que puede resistir la fuerza aplicada sobre la célula suponiendo una media de 1,5 uniones por célula y 75 pN por unión.

Para el conjunto triangular, se adhirieron más células al segundo juego de obstáculos que al primer juego. La Figuras 13A-13B muestran que la eficacia se reduce a medida que se incrementa el espaciado entre obstáculos. A medida que se incrementa el espaciado hay una región más grande fuera del radio de captura y la células nunca entran en contacto con los obstáculos. Además, para los caudales analizados (0,25 - 1 ml/h), la probabilidad global de adhesión es alta porque la fuerza por célula es menor que la fuerza para romper las uniones. Para un conjunto triangular y un espaciado de 150 micrómetros, la eficacia global de captura cae un 12 % cuando el caudal se incrementa desde 0,25 hasta 1 ml/h (Figuras 14A-14B). La adhesión no mejora yendo a caudales menores, ya que la captura hidrodinámica no mejora. La velocidad media se incrementa a medida que se incrementa el espaciado entre obstáculos. La razón para esto es que los cálculos usaron una caída de presión constante. Esto difiere de los experimentos en los que el caudal se mantiene fijo y la caída de presión varía. Los resultados pueden extrapolarse de un caso a otro por un experto en la técnica.

Un conjunto triangular repetitivo proporciona captura limitada de células objetivo porque la mayoría de la captura se produce en unas pocas primeras filas. La razón para esto es que el campo de flujo se establece en estas filas y se repite. El primer radio de captura no produce mucha captura mientras que la mayoría de la captura está dentro del segundo radio de captura (Figura 15). Una vez que las células dentro de los radios de captura son capturadas, la única manera en que podría producirse la captura es a través de colisiones célula-célula para desplazar células fuera de sus líneas de corriente o captura secundaria. En referencia a la figura 15, con el fin de potenciar la captura, después de establecerse el campo de flujo, las filas se desplazan una distancia en la dirección vertical (perpendicular al flujo) en una distancia igual a  $r_{rap2} = 0,339l$ . Las primeras cinco columnas forman dos regiones regulares de triángulos equiláteros. Esto permite que el flujo se establezca y sea compatible con la solución para un conjunto triangular equilátero. Para promover la captura de células que caen fuera de  $r_{cap2}$ , la cuarta columna está desplazada una distancia  $r_{cap2}$ . Todas las columnas están separadas por una distancia igual a  $l/2$ . Se muestra que una célula que cae fuera de  $r_{cap2}$  es capturada por el primer obstáculo del cuarto triángulo. Los triángulos 4 y 5 serían equiláteros. En el triángulo 6, el vértice 3 está desplazado hacia abajo una distancia  $r_{cap2}$ . Esta colocación puede repetirse cada tres triángulo, es decir, la distancia de repetición es de 2,5l. La Figuras 16A y 16B ilustran la eficacia de captura como función del caudal y la población relativa de las células deseadas.

De forma deseable, la capa superior está hecha de vidrio y tiene dos hendiduras perforadas con ultrasonidos para los flujos de entrada y salida. Las dimensiones de entrada/salida de la hendidura son, por ejemplo, 2 cm de largo y 0,5 mm de ancho. La Figura 17 muestra los detalles de la geometría de entrada/salida. Puede incorporarse después un colector sobre las hendiduras de entrada/salida. El colector de entrada acepta células sanguíneas de una bomba de jeringa de infusión o cualquier otro vehículo de suministro, por ejemplo, a través de un tubo flexible, biocompatible. Análogamente, el colector de salida está conectado a un depósito para recoger la solución y las células que salen del dispositivo.

La configuración y la geometría de entrada y salida pueden diseñarse de diversas formas. Por ejemplo, pueden usarse entradas y salidas circulares. Después se incorpora una región de entrada sin obstáculos al diseño para garantizar que las células sanguíneas se distribuyen uniformemente cuando alcanzan la región donde se ubican los obstáculos. Análogamente, la salida está diseñada con una región de salida sin obstáculos para recoger las células que salen uniformemente sin dañarlas.

El tamaño global de un dispositivo ejemplar se muestra en la Figura 9 (diagrama superior). La longitud es de 10 cm y la anchura es de 5 cm. El área que está cubierta con obstáculos es de 9 cm x 4,5 cm. El diseño es lo suficientemente flexible para alojar tamaños más grandes o más pequeños para aplicaciones diferentes.

El tamaño global del dispositivo puede ser más pequeña o más grande, dependiendo del rendimiento de flujo y el número de células que han de retirarse (o capturarse). Un dispositivo más grande podría incluir un número mayor de obstáculos y un área de superficie más grande para captura celular. Un dispositivo tal, puede ser necesario si la cantidad de muestra, p. ej., sangre, que se va a procesar es grande.

**Fabricación.** Un procedimiento ejemplar para fabricar un dispositivo de la invención se resume en la Figura 18. En este ejemplo, se usa fotolitografía estándar para crear un patrón de obstáculos de fotorresistente sobre una oblea de silicio sobre aislante (SOI). Una oblea SOI consta de una capa de Si (100) de 100  $\mu\text{m}$  de grosor encima de una capa de  $\text{SiO}_2$  de 1  $\mu\text{m}$  de grosor sobre una oblea de Si(100) de 500  $\mu\text{m}$  de grosor. Para optimizar la adhesión del fotorresistente, las obleas SOI pueden exponerse a vapores de hexametildisilazano a alta temperatura antes del recubrimiento de fotorresistente. La oblea se recubre por centrifugado con el fotorresistente sensible a UV, se hornea

durante 30 minutos a 90 °C, se expone a luz UV durante 300 segundos a través de una máscara de contacto de cromo, se revela durante 5 minutos en un revelador y se post-hornea durante 30 minutos a 90 °C. Los parámetros del procedimiento pueden alterarse dependiendo de la naturaleza y el grosor del fotorresistente. El patrón de la máscara de contacto cromo se transfiere al fotorresistente y determina la geometría de los obstáculos.

5 Tras la formación del patrón de fotorresistente que es el mismo que el de los obstáculos, se inicia el grabado. El SiO<sub>2</sub> puede servir como tope para el procedimiento de grabado. También se puede controlar la parada del grabado a una determinada profundidad sin el uso de una capa de tope. El patrón de fotorresistente se transfiere a la capa de Si de 100 μm de grosor en un grabador de plasma. Puede utilizarse grabado profundo multiplexado para lograr obstáculos uniformes. Por ejemplo, el sustrato se expone durante 15 segundos a un SF<sub>6</sub> que fluye en plasma rico en flúor y después el sistema se cambia a un C<sub>4</sub>F<sub>8</sub> solo que fluye en plasma rico en fluorocarbono durante 10 segundos, que recubre todas las superficies con una película protectora. En el ciclo de grabado subsiguiente, la exposición a bombardeo de iones elimina el polímero preferentemente de superficies horizontales y el ciclo se repite varias veces hasta que, p. ej., se alcanza la capa de SiO<sub>2</sub>.

15 Para acoplar un resto de unión a las superficies de los obstáculos, el sustrato puede exponerse a un plasma de oxígeno antes de la modificación de superficie para crear una capa de dióxido del silicio, a la que pueden unirse los restos de unión. Después, el sustrato puede aclararse dos veces con agua desionizada, destilada y dejarse secar al aire. La inmovilización de silano sobre vidrio expuesto se realiza sumergiendo muestras durante 30 segundos en solución al 2 % v/v recién preparada de 3-[(2-aminoetil)amino] propiltrimetoxisilano en agua seguido de lavado adicional en agua desionizada, destilada. Después, el sustrato se seca en gas nitrógeno y se hornea. Luego, el sustrato se sumerge en solución al 2,5 % v/v de glutaraldehído en solución salina tamponada con fosfato durante 1 hora a temperatura ambiente. Después el sustrato se aclara otra vez y se sumerge en una solución de 0,5 mg/ml de resto de unión, p. ej., anti-CD71, anti-CD36, anti-GPA o anti-CD45, en agua desionizada, destilada durante 15 minutos a temperatura ambiente para acoplar el agente de unión a los obstáculos. Después el sustrato se aclara dos veces en agua desionizada, destilada y se empapa durante la noche en etanol al 70 % para esterilización.

25 Existen varias técnicas distintas de las del procedimiento descrito anteriormente mediante las que pueden inmovilizarse restos de unión sobre los obstáculos y las superficies del dispositivo. Una fisioabsorción simple sobre la superficie puede ser la elección por su simplicidad y su coste. Otro enfoque puede usar monocapas agrupadas entre sí (p. ej., tioles sobre oro) que están funcionalizadas con diversos restos de unión. Pueden usarse procedimientos adicionales dependiendo de los restos de unión que se estén uniendo y el material usado para fabricar el dispositivo. Se conocen en la técnica procedimientos de modificación de la superficie. Además, algunas células pueden unirse preferentemente a la superficie no alterada de un material. Por ejemplo, algunas células pueden unirse preferentemente a superficies cargadas positivamente, cargadas negativamente o superficies hidrofóbicas o a grupos químicos presentes en algunos polímeros.

35 La siguiente etapa implica la creación de un dispositivo de flujo mediante la unión de una capa superior al silicio microfabricado que contiene los obstáculos. El sustrato superior puede ser vidrio para proporcionar observación visual de células durante y después de la captura. Puede usarse unión térmica o un epoxi curable con UV para crear la cámara de flujo. Las partes superior e inferior también pueden ajustarse por compresión usando, por ejemplo, una junta de silicona. Un ajuste por compresión tal, puede ser reversible. Se conocen otros procedimientos de unión (p. ej., unión de obleas) en la técnica. El procedimiento empleado puede depender en la naturaleza de los materiales usados.

40 El dispositivo de unión de células puede estar hecho de diferentes materiales. Dependiendo de la elección del material también pueden usarse diferentes técnicas de fabricación. El dispositivo puede estar hecho de plástico, tal como poliestireno, usando una técnica de repujado en caliente. Los obstáculos y las demás estructuras necesarias se repujan en el plástico para crear la superficie inferior. Después puede unirse una capa superior a la capa inferior. 45 El moldeo por inyección es otro enfoque que puede usarse para crear un dispositivo tal. La litografía suave también puede utilizarse para crear una cámara hecha entera de poli (dimetilsiloxano) (PDMS), o pueden crearse sólo los obstáculos en PDMS y unirse después a un sustrato de vidrio para crear la cámara cerrada. Otro enfoque más implica el uso de técnicas de colado con epoxi para crear los obstáculos a través del uso de epoxi curables con UV o temperatura sobre un patrón que tiene la réplica negativa de la estructura pretendida. El láser u otros tipos de enfoques de micromaquinado pueden utilizarse también para crear la cámara de flujo. Otros polímeros adecuados que pueden usarse en la fabricación del dispositivo son policarbonato, polietileno y poli(metil metacrilato). Además, metales como el acero y el níquel también pueden usarse para fabricar el dispositivo de la invención, p. ej., por maquinado de metal tradicional. Pueden emplearse técnicas de fabricación tridimensional (p. ej., estereolitografía) para fabricar un dispositivo en una pieza. Se conocen otros procedimientos de fabricación en la técnica.

55 **Procedimientos.** Los procedimientos en los que un dispositivo de la invención puede usarse implican poner en contacto una mezcla de células con las superficies de un dispositivo microfluídico. Una población de células de una mezcla compleja de células tal como la sangre se une después a las superficies del dispositivo. De forma deseable, al menos el 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, 98 % o 99 % de las células que son capaces de unirse a las superficies del dispositivo se retiran de la mezcla. El recubrimiento de superficie se diseña, de forma deseable, para minimizar la unión de células no específica. Por ejemplo, al menos el 99 %, 98 %, 95 %, 90 %, 80 % o 70 % de las células incapaces de unirse al resto de unión no se unen a las superficies del dispositivo. La unión selectiva en el dispositivo

- da como resultado la separación de una población celular viva específica de una mezcla de células. Los obstáculos están presentes en el dispositivo para incrementar el área de superficie para que las células interactúen con ellos mientras están en la cámara que contiene los obstáculos, de modo que la probabilidad de unión se incrementa. Las condiciones de flujo son tales que las células son manejadas muy suavemente en el dispositivo sin la necesidad de deformarse mecánicamente con el fin de entrar entre los obstáculos. Puede emplearse bombeo por presión positiva o presión negativa o flujo desde una columna de líquido para transportar células hacia dentro y fuera de los dispositivos microfluídicos de la invención. En una realización alternativa, las células se separan de una materia no celular, tal como una materia no biológica (p. ej., perlas), desechos celulares no viables (p. ej., fragmentos de membrana) o moléculas (p. ej., proteínas, ácidos nucleicos o lisados celulares).
- 5 La Figura 19 muestra células que expresan un antígeno de superficie que se une a un resto de unión recubierto sobre obstáculos, mientras otras células fluyen a través del dispositivo (la flecha pequeña sobre las células representa la direccionalidad de las células que no están unidas a la superficie). Las superficies superior e inferior del aparato de flujo también pueden estar recubiertas con el mismo resto de unión, o un resto de unión diferente, para promover la unión celular.
- 10 Los tipos celulares ejemplares que pueden separarse usando los procedimientos descritos en el presente documento incluyen glóbulos rojos adultos, glóbulos rojos fetales, trofoblastos, fibroblastos fetales, glóbulos blancos (tales como linfocitos T, linfocitos B y linfocitos T colaboradores), glóbulos blancos infectados, células madre (p. ej., células madre hematopoyéticas positivas para CD34), células epiteliales, células tumorales y organismos infecciosos (p. ej., bacterias, protozoos y hongos).
- 15 Las muestras pueden fraccionarse en múltiples componentes homogéneos usando los procedimientos descritos en el presente documento. Pueden conectarse varios dispositivos similares que contienen diferentes restos de unión específicos para una población de células en serie o en paralelo. La separación serial puede emplearse cuando se busca aislar células raras. Por otro lado, la separación paralela puede emplearse cuando se desea obtener distribución diferencial de diversas poblaciones en sangre. Las Figuras 20A y 20B muestran sistemas paralelo y serial para la separación de varias poblaciones de células de sangre. Para dispositivos paralelos, dos o más conjuntos de obstáculos que unen los diferentes tipos de células pueden ubicarse en regiones distintas o pueden ser intercalarse entre sí, p. ej., en un patrón de tipo tablero de ajedrez o en filas alternas. Además, un juego de obstáculos puede unirse a la parte superior del dispositivo y otro juego pueden unirse a la parte inferior del dispositivo. Cada juego puede derivatizarse después para unir diferentes poblaciones de células. Una vez que una muestra ha pasado a través del dispositivo, la parte superior superior y la inferior pueden separarse para proporcionar muestras aisladas de dos tipos de células diferentes.
- 20 El dispositivo de unión de células puede usarse para retirar el flujo de salida de una población de células determinada o para capturar una población específica de células que expresan una molécula de superficie concreta para análisis adicional. Las células unidas a obstáculos pueden retirarse de la cámara para análisis adicional de la población de células homogénea (Figura 21). Esta retirada puede lograrse incorporando una o más entradas y salidas ortogonales a la dirección de flujo. Las células pueden retirarse de la cámara a un caudal incrementado, que tiene un esfuerzo de cizalladura mayor, para superar la fuerza de unión entre las células y los obstáculos. Otros enfoques pueden implicar acoplar restos de unión con propiedades de unión reversibles, p. ej., que están activados por pH, temperatura o campo eléctrico. El resto de unión o la molécula unida en la superficie de las células, también puede escindirse por medios enzimáticos u otros medios químicos.
- 25 En el ejemplo de aislamiento de glóbulos rojos fetales, una muestra que ha pasado a través de un dispositivo de lisis se pasa a través de un dispositivo de unión de células, cuyas superficies están recubiertas con CD45. Los glóbulos blancos que expresan CD45 presentes en la mezcla se unen a las paredes del dispositivo y las células que pasan a través del dispositivo se enriquecen en glóbulos rojos fetales. Alternativamente, las superficies de los obstáculos y el dispositivo están recubiertas con anti-CD71 con el fin de unir glóbulos rojos nucleados fetales (los cuales expresan la proteína de superficie celular CD71) de una muestra de sangre materna completa. Un uno por ciento de los glóbulos blancos adultos también expresan CD71. Una muestra de sangre materna se pasa a través del dispositivo y ambas poblaciones de células que expresan CD71 se unen al dispositivo. Esto da como resultado la retirada de glóbulos rojos fetales de la muestra de sangre. Después, las células fetales se recogen y se analizan. Por ejemplo, las células se recogen sobre un sustrato plano para hibridación in situ por fluorescencia (FISH), seguida de la fijación de las células y el diagnóstico por imagen. La Figuras 22A-22C muestran el uso de FISH en una célula unida a un obstáculo en un dispositivo de unión de la invención. La célula, de origen fetal, se tiñe para los cromosomas X e Y usando sondas fluorescentes. Estos datos muestran la viabilidad del diagnóstico por imagen óptica de células teñidas por FISH en puestos de detección y diagnóstico de anomalías cromosómicas.
- 30 **Realizaciones alternativas.** Otra realización del dispositivo de unión celular utiliza perlas de vidrio/plástico derivatizadas químicamente atrapadas en un hidrogel poco reticulado, tal como, pero sin limitarse a, poli(vinil alcohol), poli(hidroxil-etil metacrilato), poli(acrilamida) o polietilenglicol (Figura 23). Las perlas derivatizadas químicamente sirven como obstáculos en esta realización. Una mezcla de células se dirige hacia el interior del dispositivo de retirada de células a través de dos entradas diametralmente opuestas. La presión positiva (p. ej., de una bomba de infusión o columna de líquido) o presión negativa (p. ej., de una bomba de jeringa en modo de tracción, un bomba de vacío o un aspirador) conduce el líquido a través del hidrogel. La interacción de las células de

la muestra con las perlas derivatizadas químicamente dispersas en el volumen tridimensional del hidrogel da como resultado la retirada de las células, p. ej., glóbulos blancos (selección negativa), o la captura de células, p. ej., glóbulos rojos fetales (selección positiva). El peso molecular, la densidad de reticulación, la densidad de perlas y la distribución y los caudales pueden optimizarse para permitir la máxima interacción y captura de células relevantes por las perlas. El alto contenido en agua del hidrogel proporciona una estructura para atrapar las perlas a la vez que permite una facilidad de flujo a través de la muestra. La muestra se recoge después a través de dos salidas diametralmente opuestas. El diseño de canal entrada/salida bifurcado garantiza la máxima homogeneidad en la distribución de la muestra a través del volumen del hidrogel.

En otra realización más, las perlas son reemplazadas por derivatización química directa de las cadenas laterales del polímero del hidrogel con el resto de unión (p. ej., un ligando sintético o anticuerpo monoclonal (Acm)). Este enfoque puede proporcionar una densidad muy alta de sitios de captura moleculares y garantizar de este modo una probabilidad de captura más alta. Una ventaja añadida de este enfoque es un uso potencial del dispositivo de retirada de células a base de hidrogel como sensor para captura de células fetales en el modo de selección positiva (selecciona células fetales con Acm), por ejemplo, si la química de la estructura del polímero y la cadena lateral está diseñada para capturar las células fetales y además reticular el hidrogel en el procedimiento. Las células se unen a numerosas cadenas laterales mediante interacción antígeno-Acm y, por tanto, sirven como reticulante para las cadenas de polímero y la reducción en la salida de flujo a lo largo del tiempo debido a la densidad de reticulación del polímero incrementada puede equipararse matemáticamente al número de células fetales capturadas en la matriz 3D del polímero. Cuando se captura el número deseado de células fetales (medido por reducción en el caudal de salida), el dispositivo puede parar de procesar adicionalmente la muestra materna y proceder al análisis de las células fetales. Las células fetales capturadas pueden liberarse para análisis mediante el uso de un agente de acoplamiento fotoactivo en la cadena lateral. El agente fotorreactivo acopla el ligando objetivo o Acm a la estructura del polímero y, al exponerse a un pulso de radiación UV o IR, los ligandos o Acm y las células asociadas se liberan.

### **C. Selección de células**

En este dispositivo, una mezcla de células de la que normalmente se han retirado las células no deseadas se selecciona en un dispositivo microfluídico. Un dispositivo ejemplar para esta etapa se describe en la publicación internacional N.º WO 01/35071. Las células del dispositivo se someten entonces a ensayo, p. ej., por microscopia o ensayo colorimétrico, para ubicar las células deseadas. Las células deseadas pueden analizarse entonces en el conjunto, p. ej., por lisis seguida por PCR, o las células pueden recogerse del conjunto mediante una variedad de mecanismos, p. ej., pinzas ópticas. En el dispositivo ejemplar descrito en el documento WO 01/35071, las células se introducen en el dispositivo de selección y pueden depositarse de forma pasiva en agujeros realizados en el dispositivo. Alternativamente, puede emplearse presión positiva o negativa para dirigir las células a los agujeros del conjunto. Una vez las células se han depositado en los agujeros, las células seleccionadas pueden liberarse individualmente del conjunto mediante activadores, p. ej., bombas activadas por burbujas. Otros procedimientos para inmovilizar y liberar células, p. ej., atrapamiento dielectroforético, también pueden usarse en un dispositivo de selección. Una vez liberadas del conjunto, las células pueden ser recogidas y sometidas a análisis. Por ejemplo, un glóbulo rojo fetal se identifica en el conjunto y después se analiza para evaluar anomalías genéticas. Los glóbulos rojos fetales pueden ser identificados morfológicamente o por un marcador molecular específico (p. ej., hemoglobina fetal, receptor de transferrina (CD71), receptor de trombospondina (CD36) o glicoforina A (GPA)).

### **D. Separación basada en el tamaño**

Otro dispositivo es un dispositivo para la separación de partículas basada en el uso de tamices que permiten el paso selectivo de partículas en función de su tamaño, forma o deformabilidad. El tamaño, forma o deformabilidad de los poros del tamiz determina los tipos de células que pueden pasar a través del tamiz. Pueden colocarse dos o más tamices en serie o en paralelo, p. ej., para retirar células de tamaño creciente sucesivamente.

**Dispositivo.** En una realización, el tamiz incluye una serie de obstáculos que están separados por un espacio. Puede usarse una variedad de tamaños de obstáculo, geometrías y colocaciones en dispositivos de la invención. Pueden usarse en un tamiz formas diferentes de obstáculos, p. ej., aquellos con secciones transversales circulares, cuadradas, rectangulares, ovaladas o triangulares. El tamaño del hueco entre los obstáculos y la forma de los obstáculos puede optimizarse para garantizar una filtración rápida y eficaz. Por ejemplo, el intervalo de tamaños de los GR está en el orden de 5-8  $\mu\text{m}$ , y el intervalo de tamaños de las plaquetas está en el orden de 1-3  $\mu\text{m}$ . El tamaño de todos los GB es más grande de 10  $\mu\text{m}$ . Los huecos grandes entre obstáculos incrementan la velocidad a la que los GR y las plaquetas pasan a través del tamiz, pero un tamaño de hueco incrementado también incrementa el riesgo de perder WBC. Los tamaños de hueco menores garantizan una captura más eficaz de GB pero también una velocidad de paso más lenta para los GR y plaquetas. Dependiendo de el tipo de aplicación, pueden usarse diferentes geometrías.

Además de los obstáculos, los tamices pueden fabricarse mediante otros procedimientos. Por ejemplo, un tamiz podría formarse por moldeo, electroformado, grabado, perforación o creando agujeros de otro modo en una hoja de material, p. ej., silicio, níquel o PDMS. Alternativamente, podría emplearse una matriz de polímero o matriz inorgánica (p. ej., de zeolita o cerámica) que tenga un tamaño de poro apropiado como tamiz en los dispositivos descritos en el presente documento.

Un problema asociado con dispositivos de la invención es la obstrucción de los tamices. Este problema puede reducirse mediante formas y diseños de tamiz apropiados y también tratando los tamices con recubrimientos no adhesivos tales como albúmina de suero bovino (BSA) o polietilenglicol (PEG), como se describe en el presente documento. Un procedimiento para evitar la obstrucción es minimizar el área de contacto entre el tamiz y las partículas.

El esquema de un dispositivo de filtración de bajo esfuerzo de cizalladura se muestra en la Figura 24. El dispositivo tiene un canal de entrada que conduce al interior de un difusor, el cual es una porción ensanchada del canal. Normalmente, el canal se ensancha con un patrón con forma de V. El difusor contiene dos tamices que tienen poros con una forma para filtrar, por ejemplo, GR y plaquetas más pequeños de sangre, mientras enriquece la población de GB y GR fetales. La geometría del difusor ensancha las líneas de corriente de flujo laminar haciendo que más células entren en contacto con los tamices mientras se mueven a través del dispositivo. El dispositivo contiene 3 salidas, dos salidas recogen células que han pasado a través de los tamices, p. ej., los GR y plaquetas, y una salida recoge los GB y GR fetales enriquecidos.

El dispositivo difusor normalmente no garantiza la retirada del 100 % de los GR y plaquetas. No obstante, las relaciones iniciales GR:GB de 600:1 pueden mejorarse a relaciones alrededor de 1:1. Las ventajas de este dispositivo son que los caudales son lo suficientemente bajos para que el esfuerzo de cizalladura sobre las células no afecte al fenotipo o viabilidad de las células y que los filtros garantizan que todas las células grandes (es decir, aquellas que no pueden pasar a través de los tamices) quedan retenidas de forma que la pérdida de células grandes se minimiza o elimina. Esta propiedad también garantiza que la población de células que pasa a través del tamiz no contiene células grandes, aunque pueden perderse algunas células más pequeñas. En ensanchamiento del ángulo del difusor dará como resultado un factor de enriquecimiento más grande. El enriquecimiento mayor también puede obtenerse mediante la colocación en serie de más de un difusor, donde la salida de un difusor alimenta la entrada de un segundo difusor. El ensanchamiento de los huecos entre los obstáculos puede agilizar el procedimiento de retirada con el riesgo de perder células grandes a través de los poros más grandes de los tamices. Para separar glóbulos rojos maternos de glóbulos rojos nucleados fetales, un espaciado ejemplar es de 2 - 4  $\mu\text{m}$ .

**Procedimiento.** El dispositivo es un separador de células de flujo continuo, p. ej., que filtra mayores cantidades de GB y GR fetales a partir de sangre. La ubicación de los tamices en el dispositivo se escoge para garantizar que el máximo número de partículas entran en contacto con los tamices, mientras al mismo tiempo evitan la obstrucción y permiten la recuperación de las partículas tras la separación. En general, las partículas se mueven a través de sus líneas de flujo laminar que se mantienen debido a un número de Reynolds extremadamente bajo en los canales del dispositivo, los cuales tienen normalmente un tamaño de micras.

**Fabricación.** Pueden usarse técnicas sencillas de microfabricación como litografía suave con poli(dimetilsiloxano) (PDMS), colado de polímeros (p. ej., usando epoxis, acrílicos o uretanos), moldeo por inyección, repujado en caliente de polímeros, micromaquinado con láser, micromaquinado de superficie de película fina, grabado profundo de vidrio y silicio, electroformado y técnicas de fabricación en 3D tales como estereolitografía para la fabricación de los canales y tamices de dispositivos de la invención. La mayoría de los procedimientos enumerados anteriormente usan fotomáscaras para la duplicación de microcaracterísticas. Para características de tamaños mayores de 5  $\mu\text{m}$ , pueden usarse máscaras de emulsión a base de transparencias. Las características de tamaños entre 2 y 5  $\mu\text{m}$  pueden requerir fotomáscaras a base de vidrio. Para características más pequeñas, puede usarse una máscara de escritura directa por haz de electrones a base de vidrio. Después, las máscaras se usan para definir un patrón de fotorresistente para grabado en el caso de silicio o vidrio o definir réplicas negativas, p. ej., usando fotorresistente SU-8, que puede usarse después como patrón para moldeo por réplica de materiales poliméricos como PDMS, epoxis y acrílicos. Los canales fabricados pueden unirse después sobre un sustrato rígido como vidrio para completar el dispositivo. Se conocen en la técnica otros procedimientos para la fabricación. Un dispositivo de la invención puede fabricarse a partir de una sólo material o una combinación de materiales.

**Ejemplo.** En un ejemplo, un dispositivo para separación basada en el tamaño de GR y plaquetas más pequeños de los GB más grandes se fabricó usando técnicas de litografía suave sencillas. Se fabricó una fotomáscara de cromo que tenía las características y la geometría del dispositivo y se usó para estampar una oblea de silicio con una réplica negativa del dispositivo en fotorresistente SU-8. Este patrón se usó después para fabricar estructuras de canal y tamiz en PDMS usando técnicas de moldeo de réplicas estándar. El dispositivo de PDMS se unió a una lámina de vidrio después de tratamiento con plasma con  $\text{O}_2$ . La geometría de difusor se usa para ensanchar las líneas de corriente de flujo laminar para garantizar que la mayoría de las partículas o células que fluyen a través del dispositivo interaccionará con los tamices. Los GR y plaquetas más pequeños pasan a través de los tamices y los GB más grandes están confinados en el canal central.

#### **Combinación de dispositivos**

Los dispositivos descritos en el presente documento pueden usarse solos o en cualquier combinación. Además, las etapas de los procedimientos descritos en el presente documento pueden emplearse en cualquier orden. Una representación esquemática de un dispositivo de combinación para detectar y aislar glóbulos rojos fetales se muestra en la Figura 25. En un ejemplo, una muestra puede ser procesada utilizando la etapa de lisis celular y después las células deseadas pueden atraparse con un dispositivo de unión de células. Si las células atrapadas son

lo suficientemente puras, no se requiere ninguna etapa de procesamiento adicional. Alternativamente, puede emplearse sólo una de las etapas de lisis o de unión antes de la selección. En otro ejemplo, puede someterse una mezcla de células a lisis, separación basada en el tamaño, unión y selección.

5 Los procedimientos de la invención pueden llevarse a cabo en un dispositivo integrado que contiene regiones para lisis celular, unión de células, selección y separación basada en el tamaño. Alternativamente, los dispositivos pueden estar separados y las poblaciones de células obtenidas en cada etapa pueden recogerse y transferirse manualmente a dispositivos para etapas de procesamiento adicionales.

Puede usarse el bombeo por presión positiva o negativa para transportar células a través de los dispositivos microfluídicos de la invención.

10 **Análisis**

Después de enriquecerse por uno o más de los dispositivos descritos en el presente documento, las células pueden ser recogidas y analizadas por diversos procedimientos, p. ej., análisis de ácido nucleico. La muestra también puede procesarse adicionalmente antes del análisis. En un ejemplo, las células pueden recogerse sobre un sustrato plano para hibridación in situ por fluorescencia (FISH), seguida de la fijación de las células y el diagnóstico por imagen. Tal análisis puede usarse para detectar anomalías fetales como síndrome de Down, síndrome de Edward, síndrome de Patau, síndrome de Klinefelter, síndrome de Turner, anemia de células falciformes, distrofia muscular de Duchenne y fibrosis quística. El análisis también puede realizarse para determinar un rasgo concreto de un feto, p. ej., el sexo.

**Otras realizaciones**

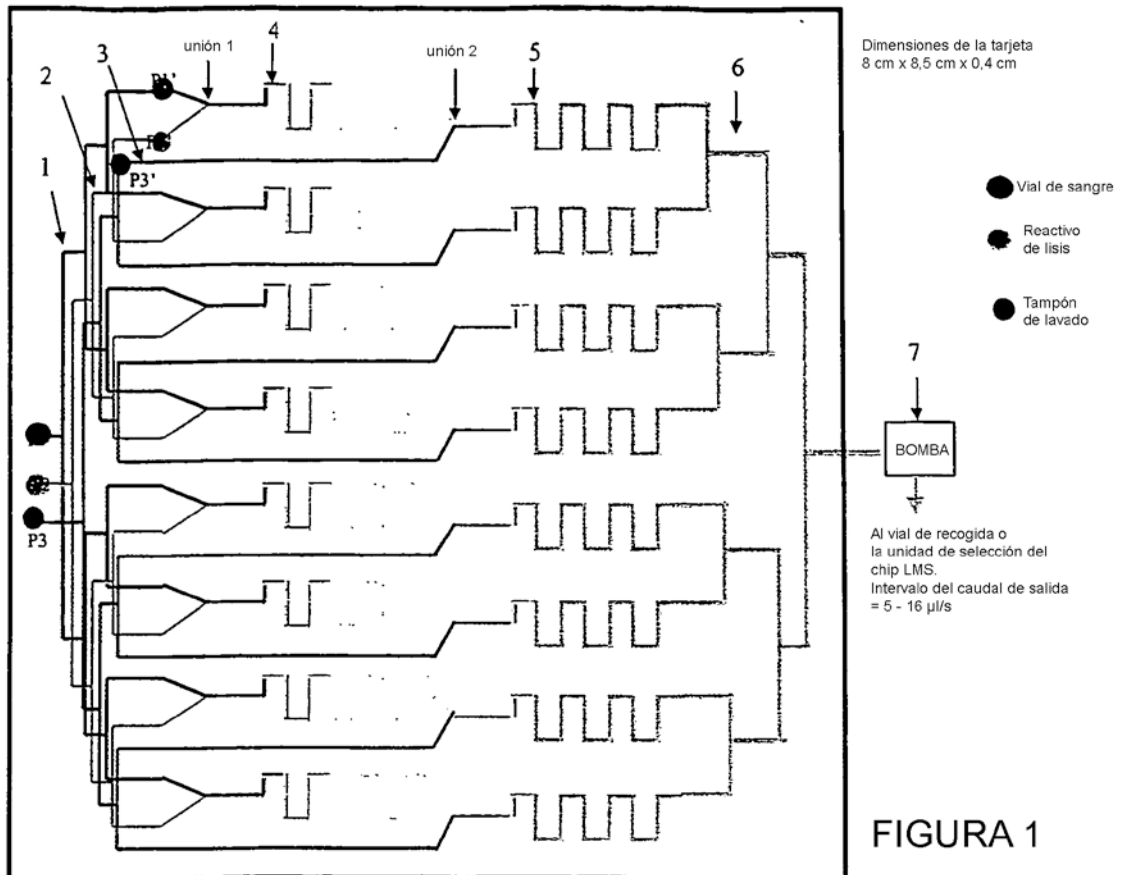
20 Por el presente documento se hace referencia a todas publicaciones de patente y solicitudes de patente mencionadas en la memoria descriptiva anterior en el contexto en el que se mencionan respectivamente. Serán patentes diversas modificaciones y variaciones del sistema descrito de la invención para aquellos expertos en la técnica sin apartarse del alcance de la invención. Aunque la invención se ha descrito en conexión con realizaciones específicas, debería entenderse que la invención como se reivindica no debería limitarse indebidamente a tales realizaciones específicas. De hecho, se pretende que diversas modificaciones de los modos descritos para llevar a cabo la invención que son obvias para aquellos expertos en la técnica estén dentro del alcance de la invención.

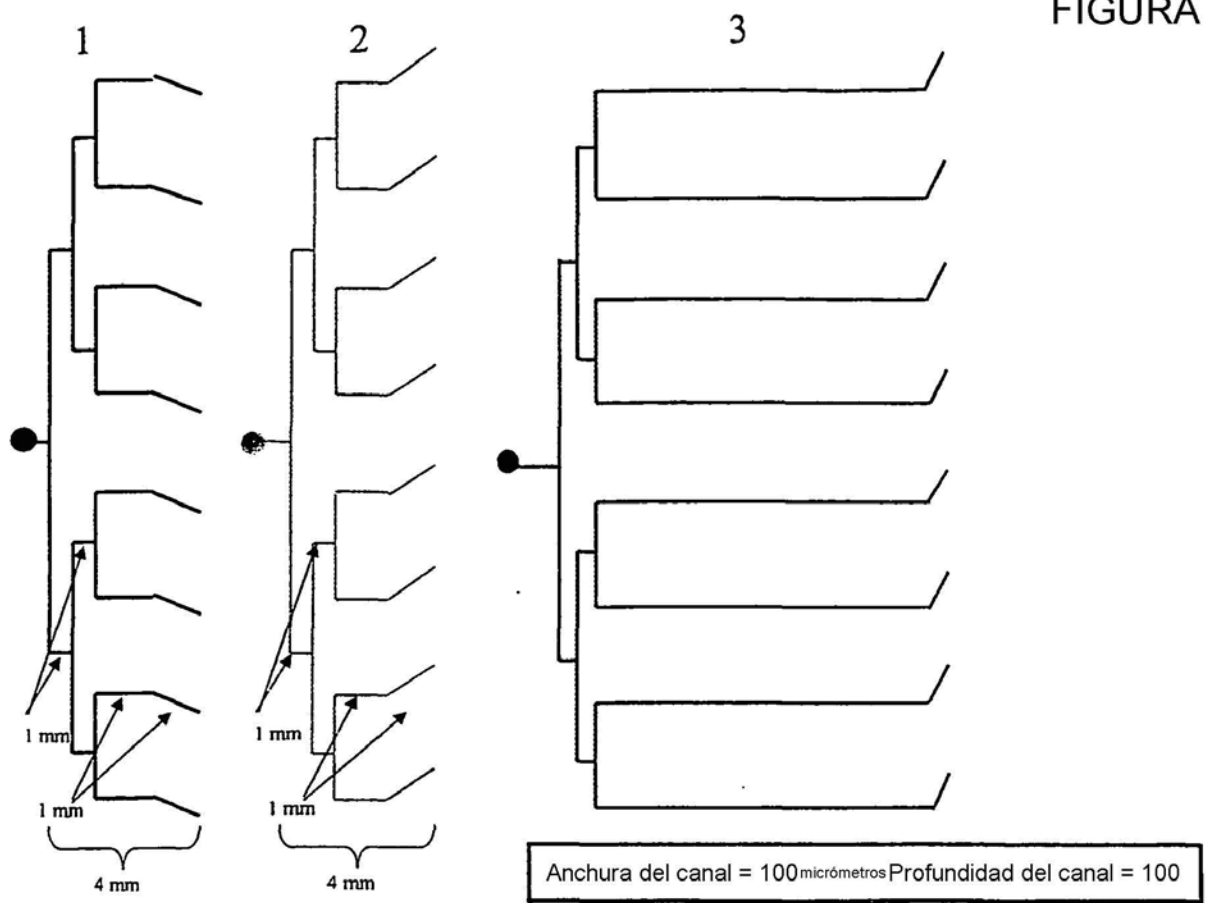
Otras realizaciones están en las reivindicaciones.



**REIVINDICACIONES**

1. Un dispositivo microfluídico que comprende:
  - 5 (a) una primera región de obstáculos fijos dispuestos en un canal microfluídico que define una vía de flujo de líquido, en el que los obstáculos de la primera región se unen preferentemente a un primer tipo de célula comparado con un segundo tipo de célula, en el que los obstáculos están colocados en al menos dos columnas y al menos dos filas, en el que las filas están colocadas perpendiculares a la vía de flujo de líquido en relación con los obstáculos de la fila anterior, formando de este modo un conjunto de obstáculos triangular equilátero; y
  - 10 (b) una segunda región de obstáculos fijos dispuestos en el canal microfluídico, en el que los obstáculos de la segunda región se unen preferentemente a un tercer tipo de célula comparado con un cuarto tipo de célula, en el que los obstáculos están colocados en al menos dos columnas y al menos dos filas, en el que las filas están colocadas perpendiculares a la vía de flujo de líquido y los obstáculos de cada fila sucesiva están desplazados en una dirección perpendicular a la vía de flujo de líquido en relación con los obstáculos de la fila anterior, formando de este modo un conjunto de obstáculos triangular equilátero,
  - 15 en el que la segunda región está situada más allá de la primera región en el canal microfluídico.
2. El dispositivo microfluídico de la reivindicación 1, en el que los obstáculos están recubiertos con un anticuerpo.
3. El dispositivo microfluídico de la reivindicación 1 o 2, en el que un espaciado entre obstáculos es de al menos 50  $\mu\text{m}$ .
4. El dispositivo microfluídico de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que un espaciado entre obstáculos es de 100  $\mu\text{m}$  como máximo.
5. El dispositivo microfluídico de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que los obstáculos de la primera región, la segunda región, o ambas regiones primera y segunda, son de tamaño sustancialmente uniforme.
6. El dispositivo microfluídico de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, que comprende además una bomba.
7. El dispositivo microfluídico de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que el dispositivo es ópticamente transparente o tiene ventanas transparentes.
8. El dispositivo microfluídico de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que los obstáculos están en contacto tanto con la parte superior como con la inferior de la cámara.
9. El dispositivo microfluídico de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que los obstáculos tienen una sección transversal cilíndrica.
10. El dispositivo microfluídico de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que el dispositivo está fabricado a partir de un polímero.
11. El dispositivo microfluídico de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que los obstáculos están colocados para permitir el flujo de células sin que sean comprimidas mecánicamente entre los obstáculos y, por tanto, dañadas, durante el proceso del flujo.
12. El uso de un dispositivo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 para diagnóstico médico.





Una realización de cámaras de dilución/reacción

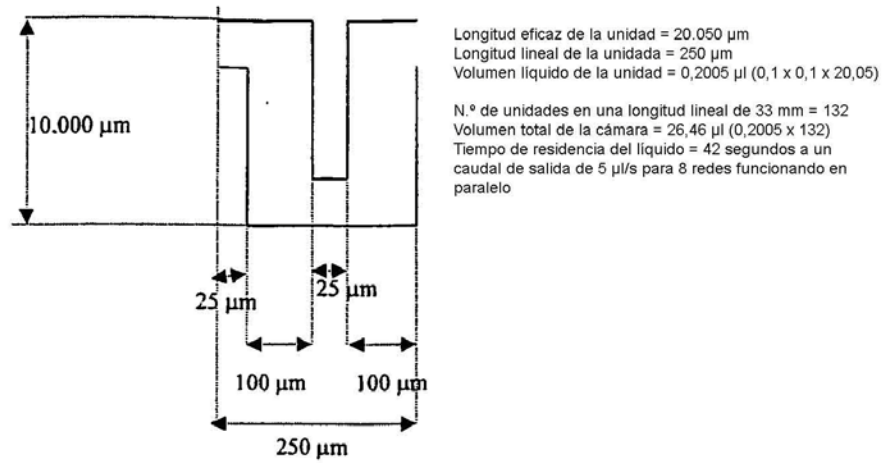


FIGURA 3

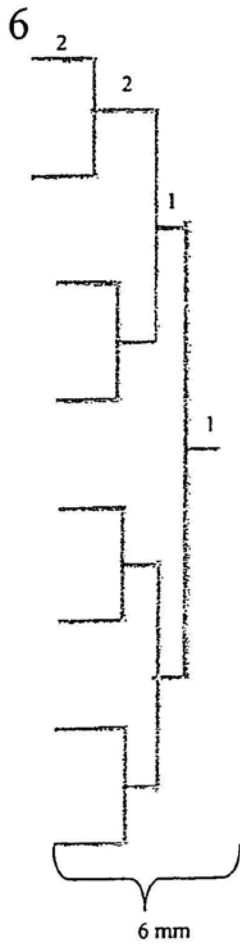


FIGURA 4

7



Bomba peristáltica o bomba de jeringa  
de presión-tracción funcionando en  
modo de tracción

Anchura del canal = 100      Profundidad del canal = 100 micró-  
metros

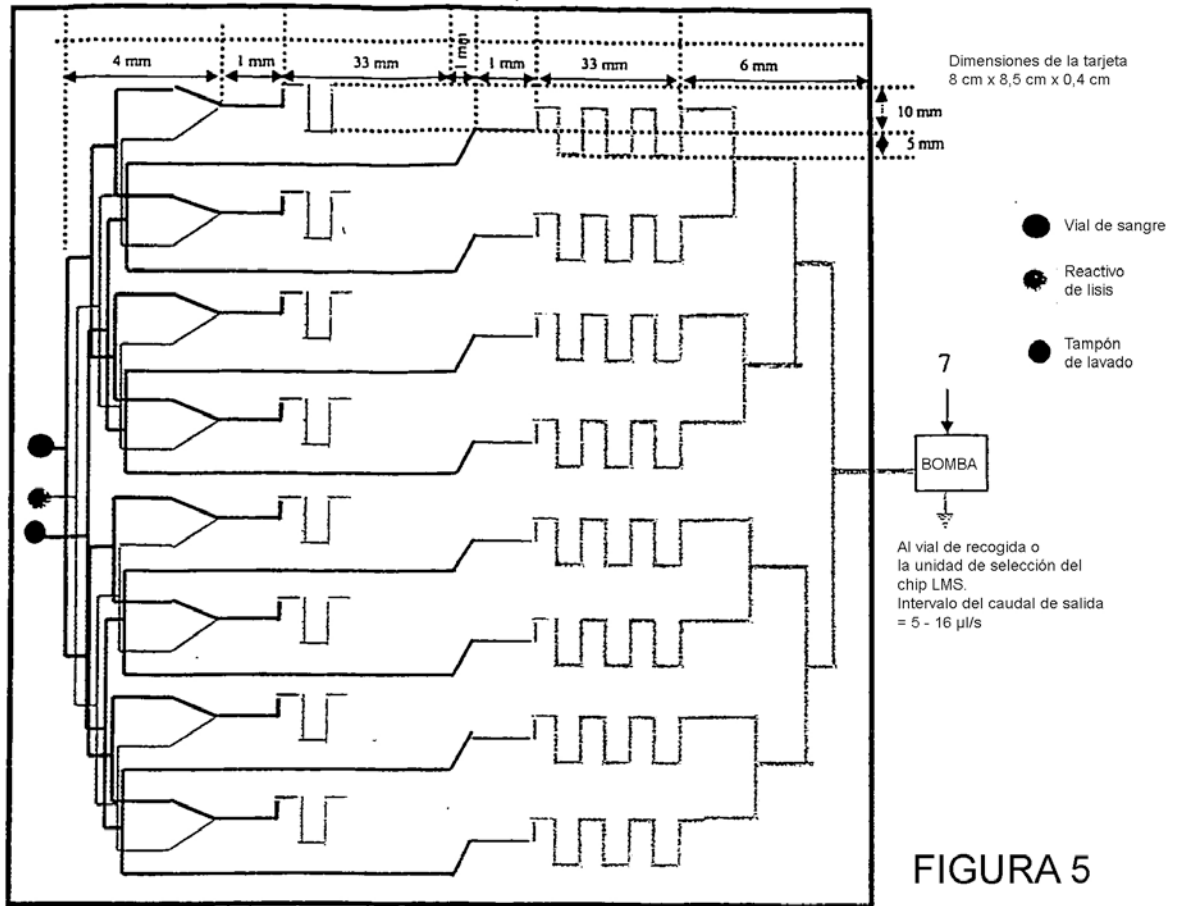


FIGURA 6a

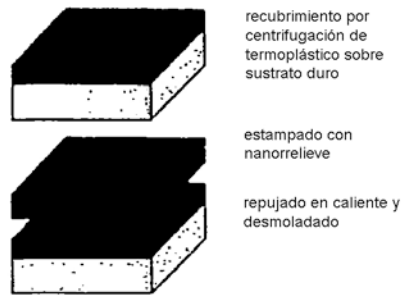
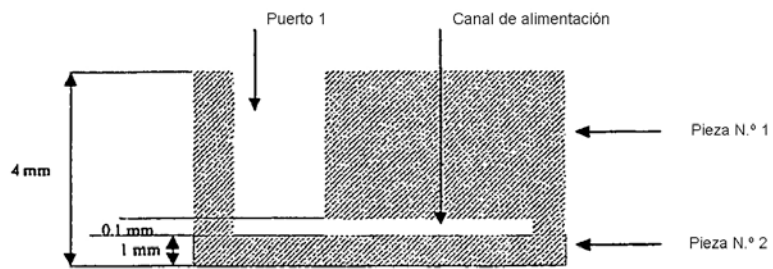


FIGURA 6b



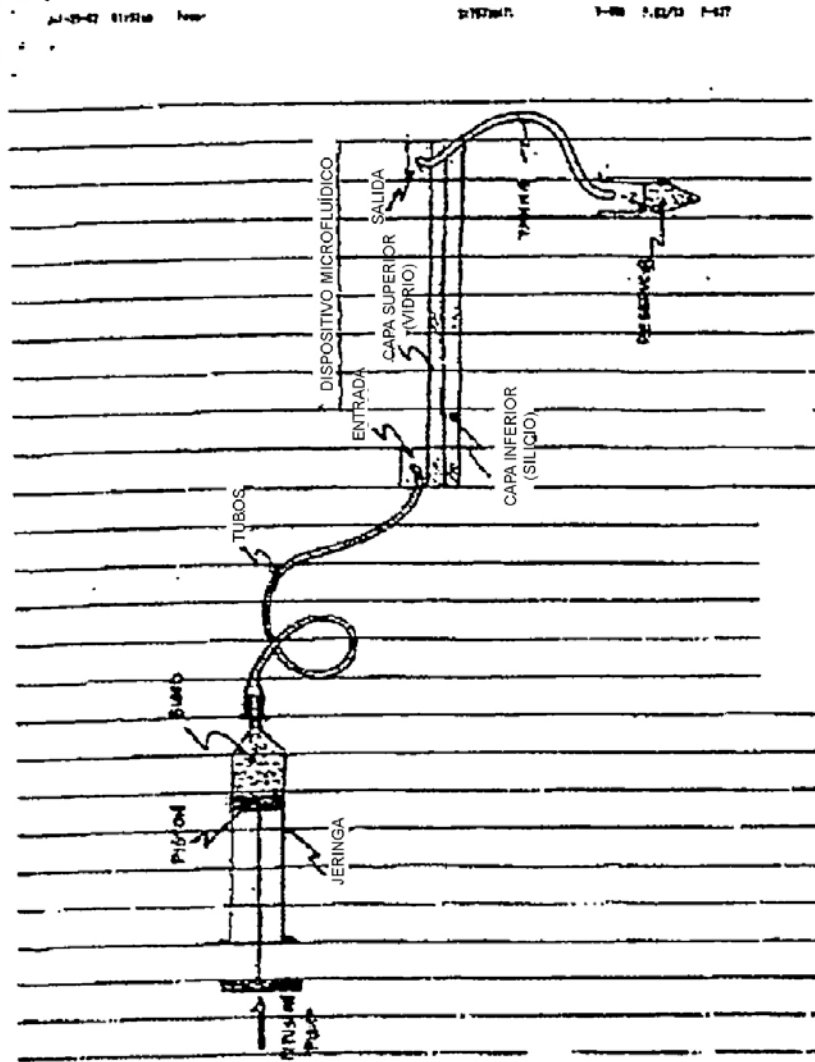


FIGURA 7



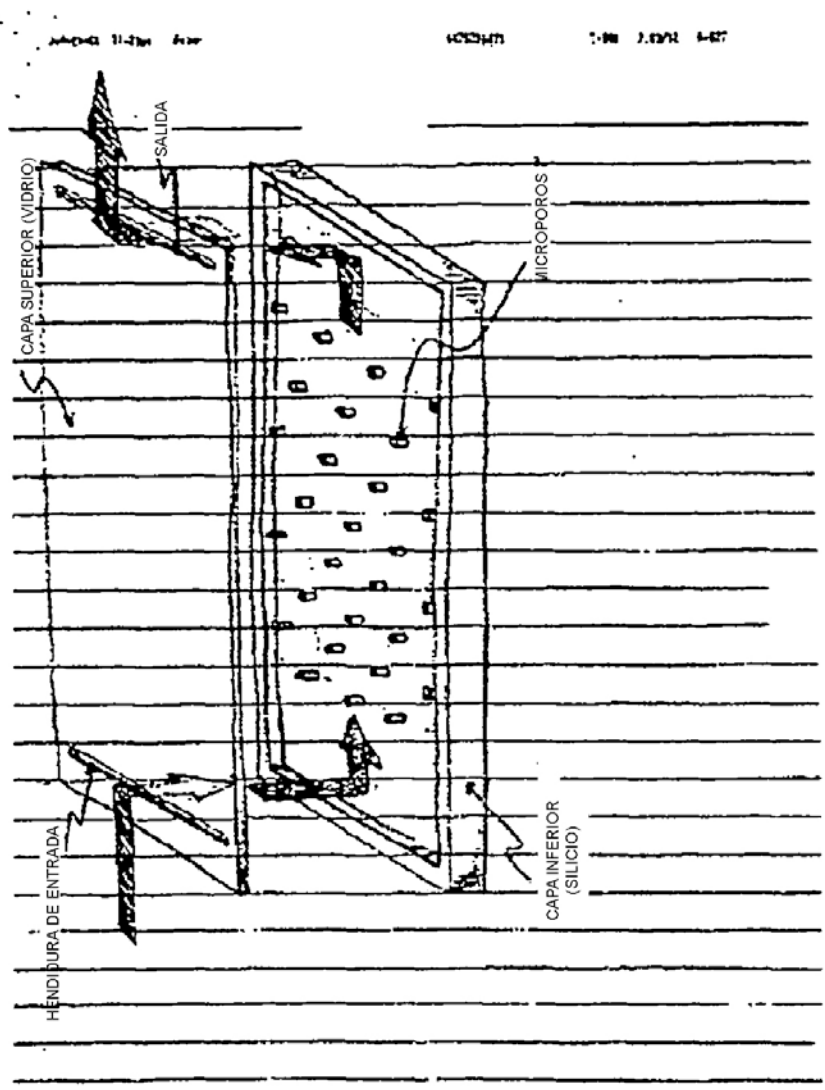


FIGURA 8

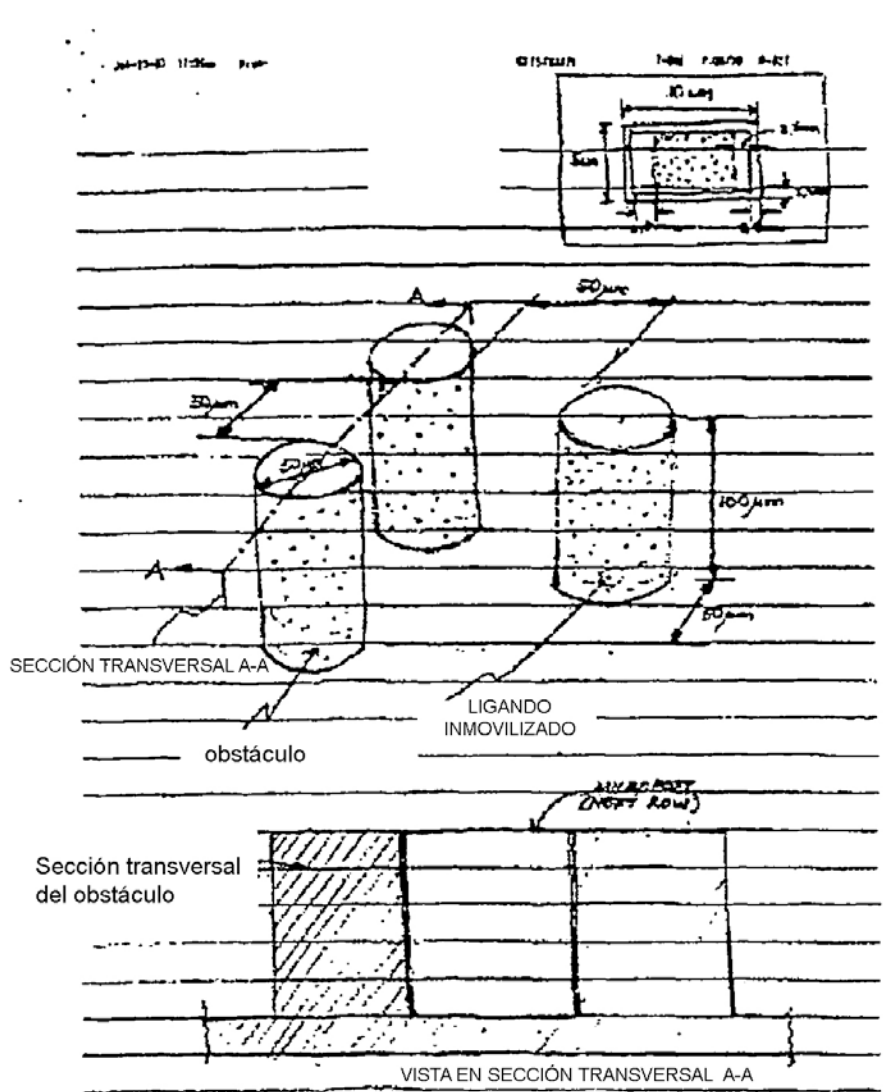


FIGURA 9

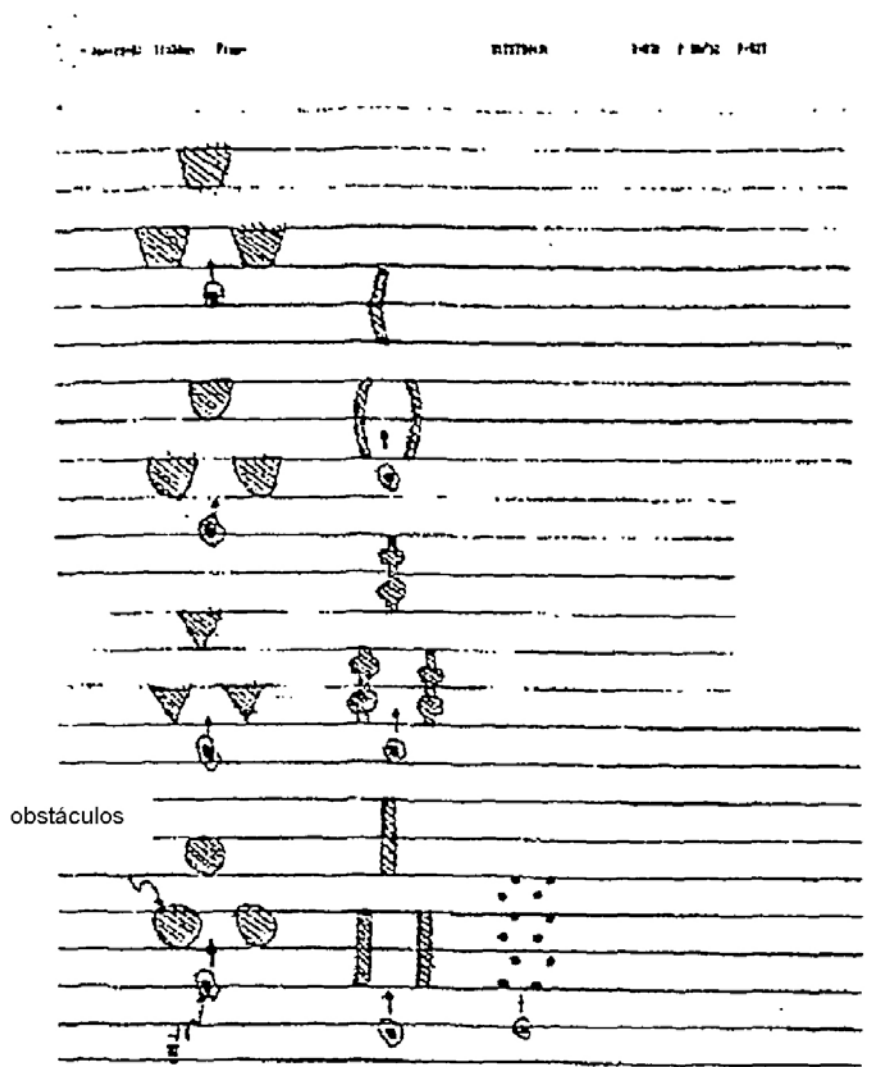


FIGURA 10

FIG. 11A

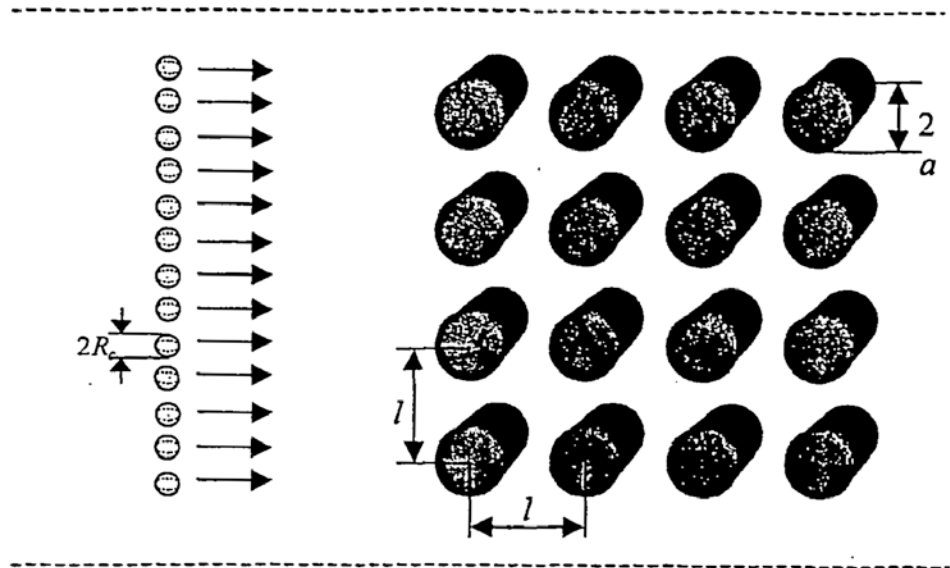


FIG. 11B

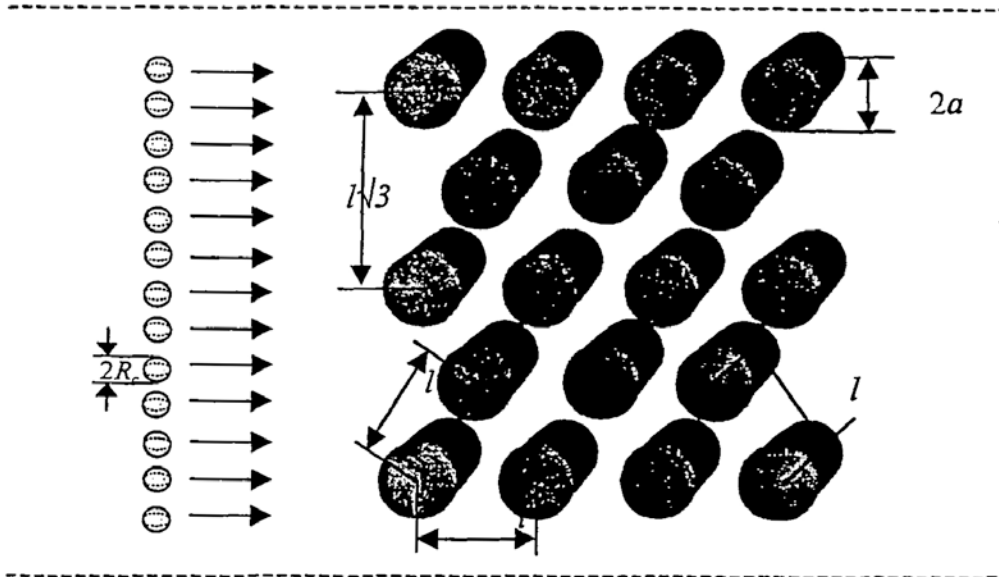


FIG. 12A

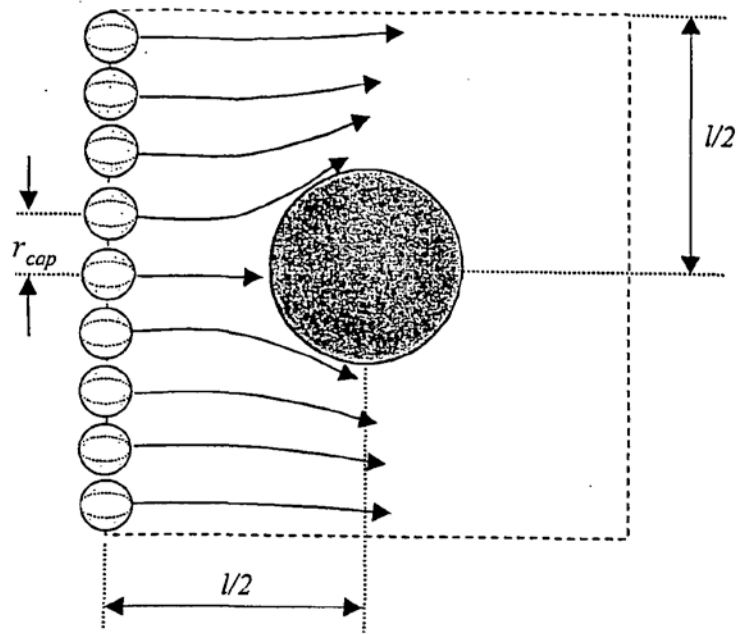
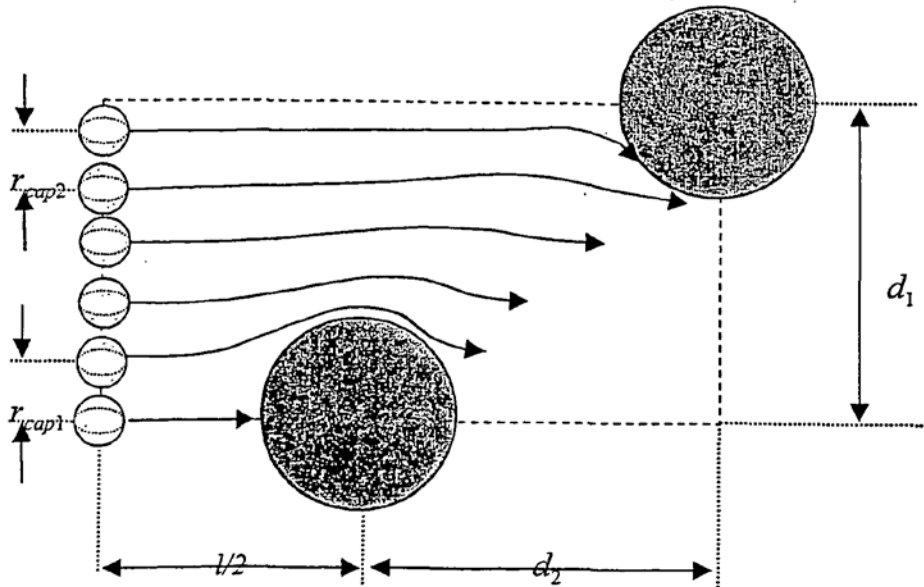
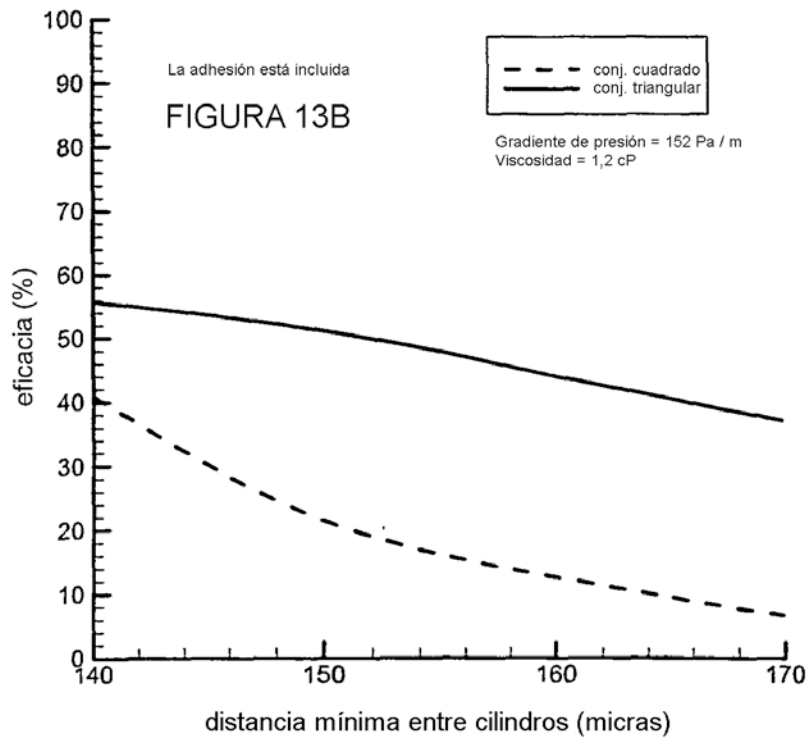
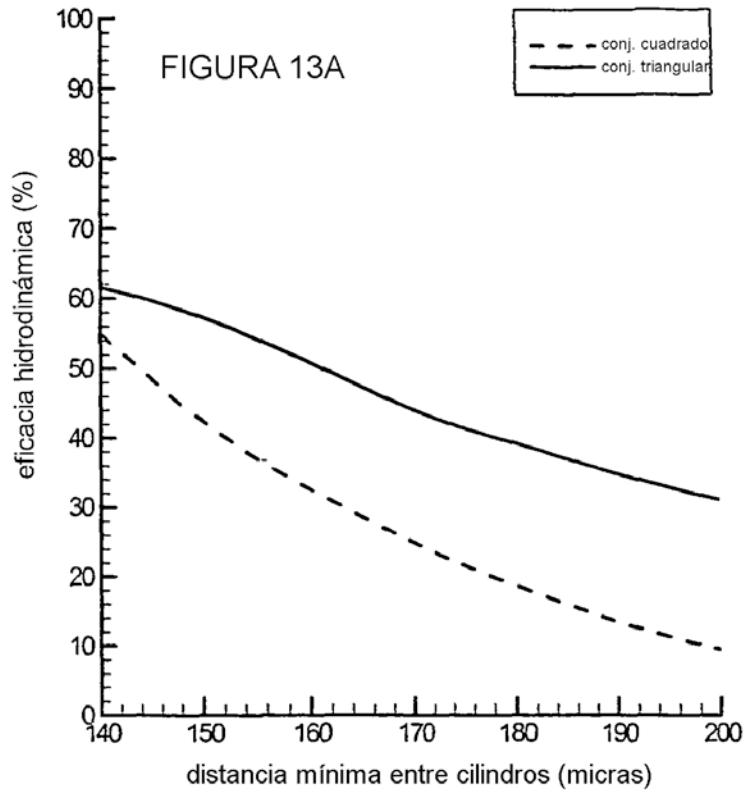


FIG. 12B





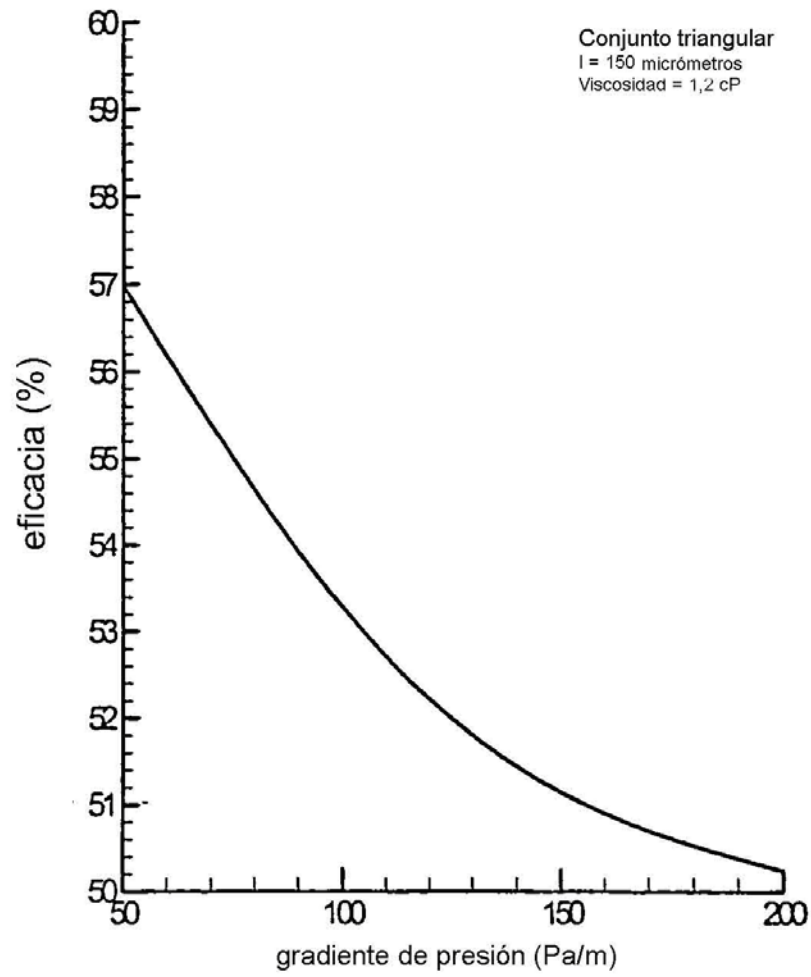


FIG. 14A

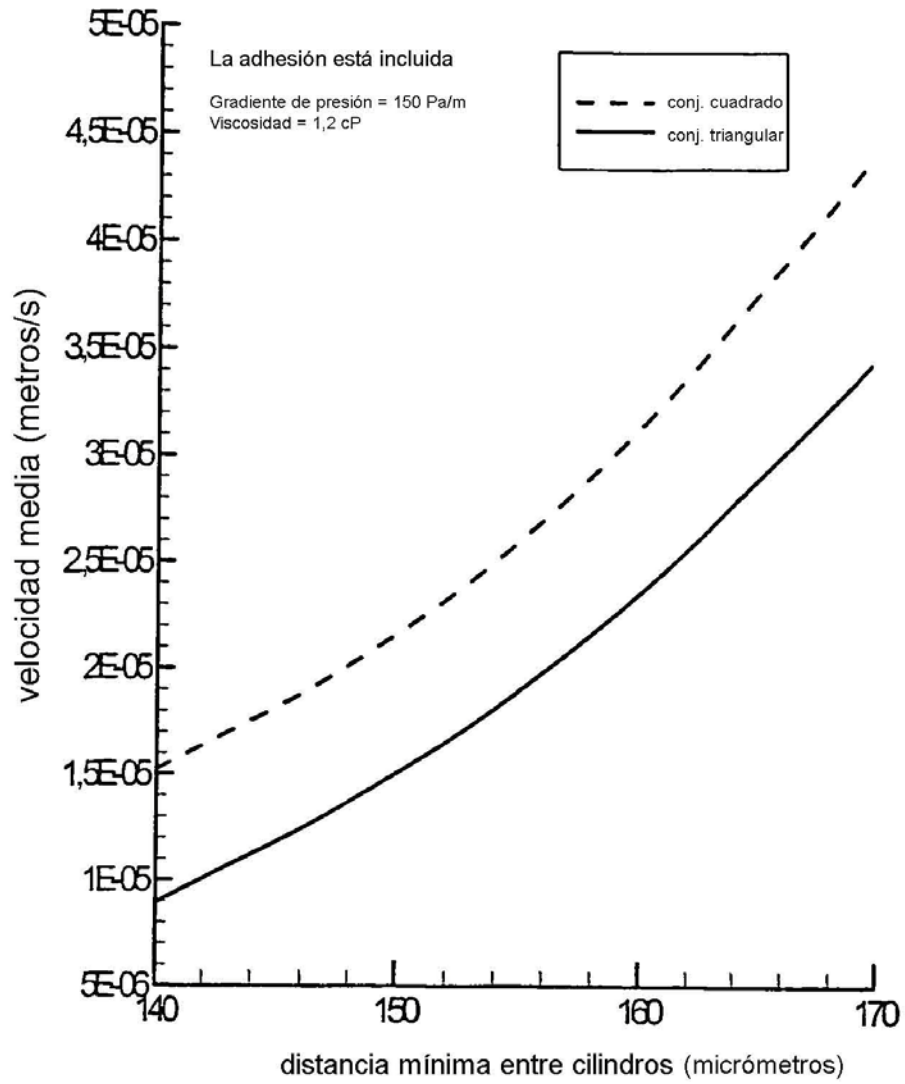


FIG. 14B



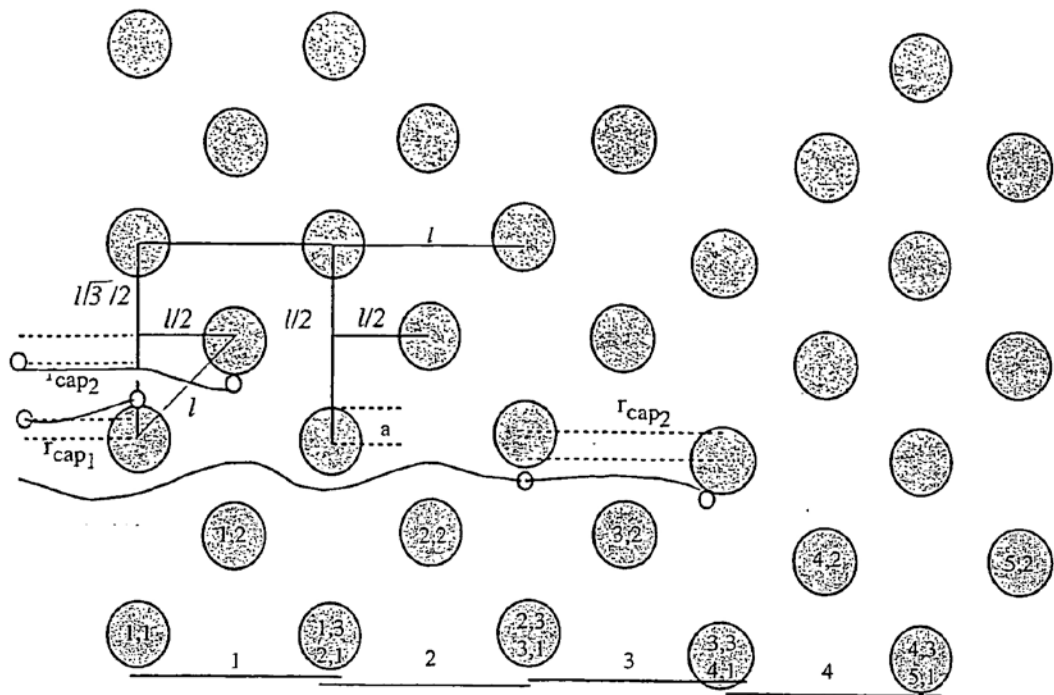


FIG. 15

FIG. 16A

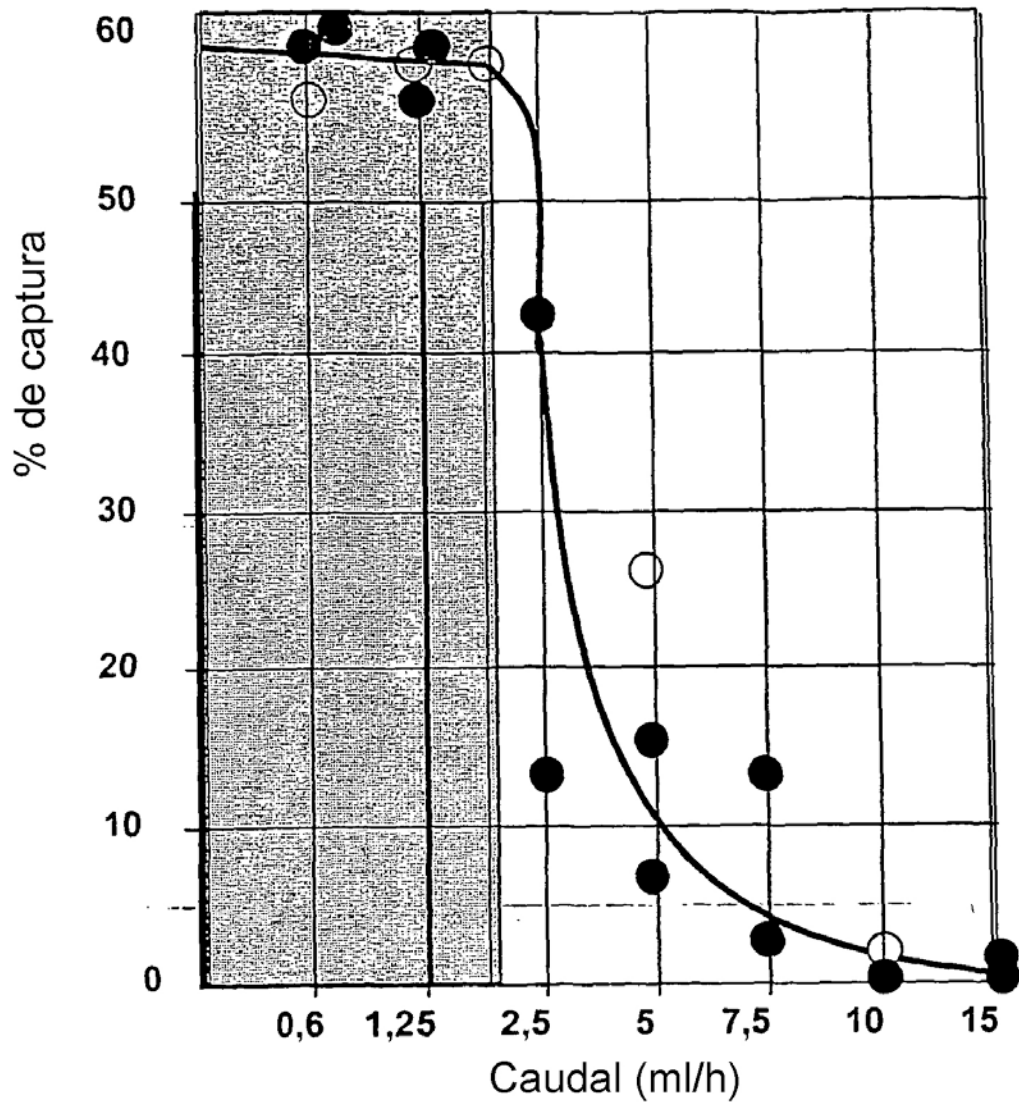
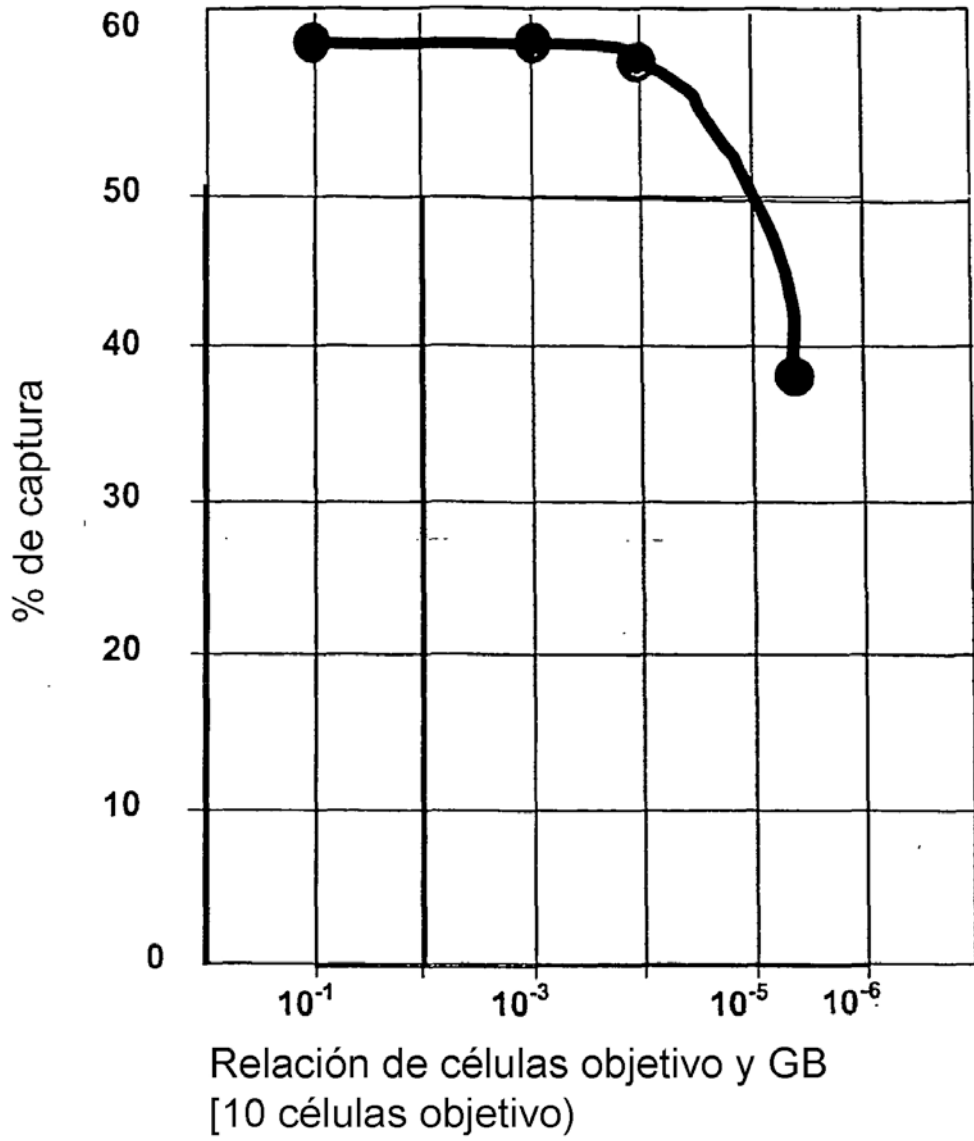


FIG. 16B



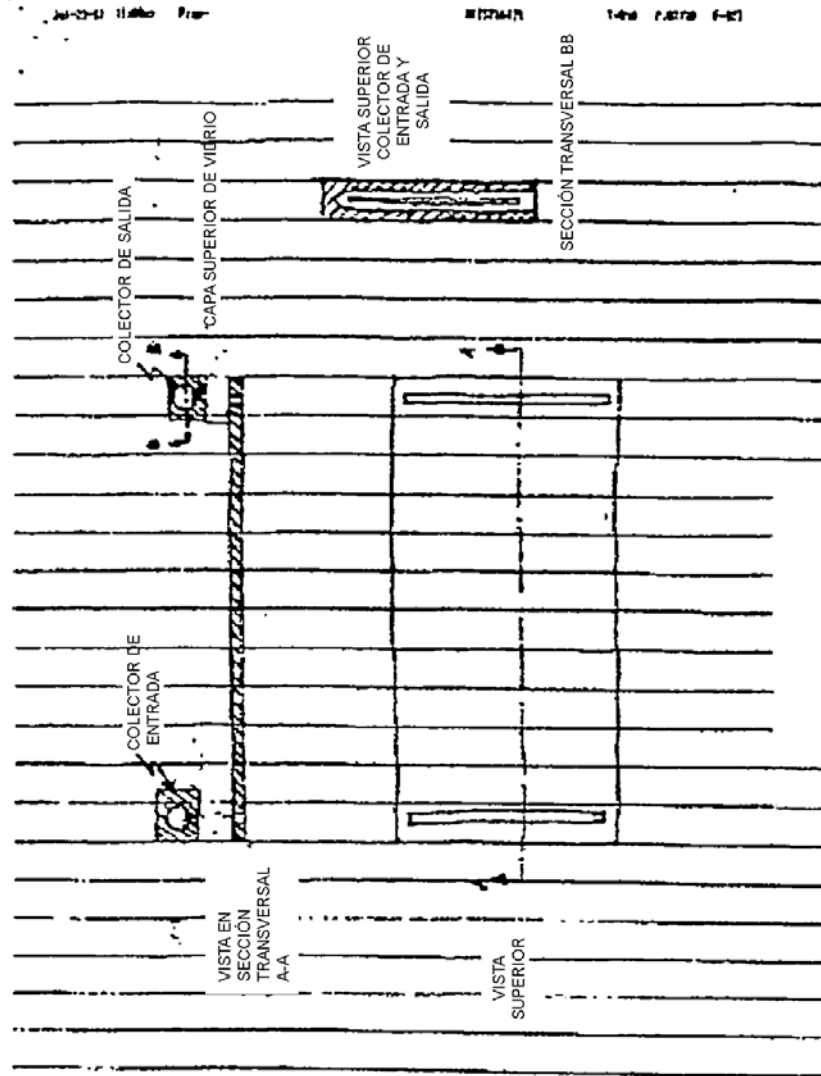


FIGURA 17

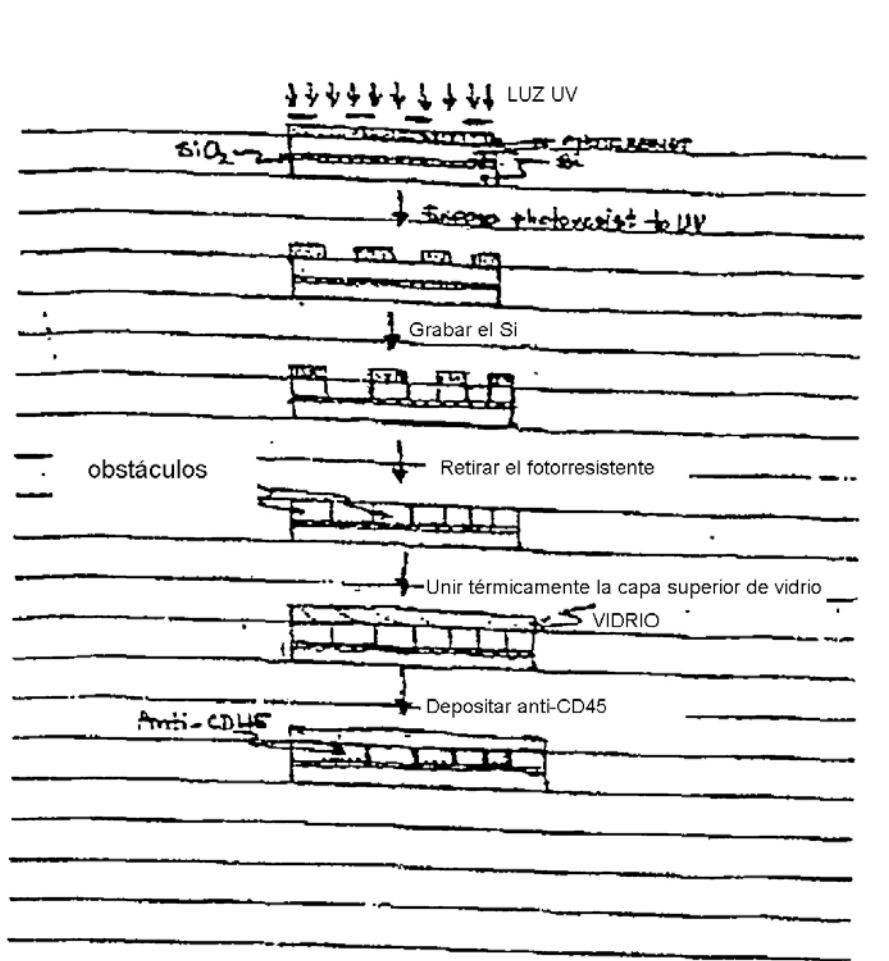


FIGURA 18

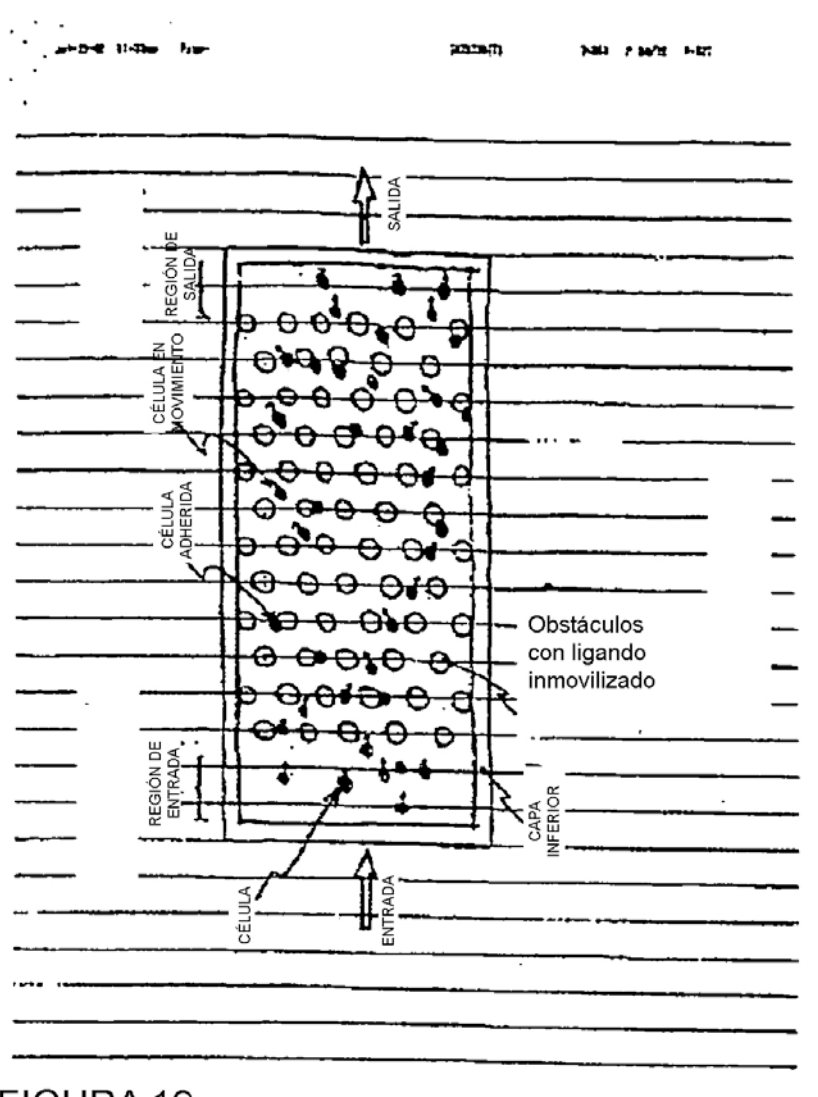


FIGURA 19

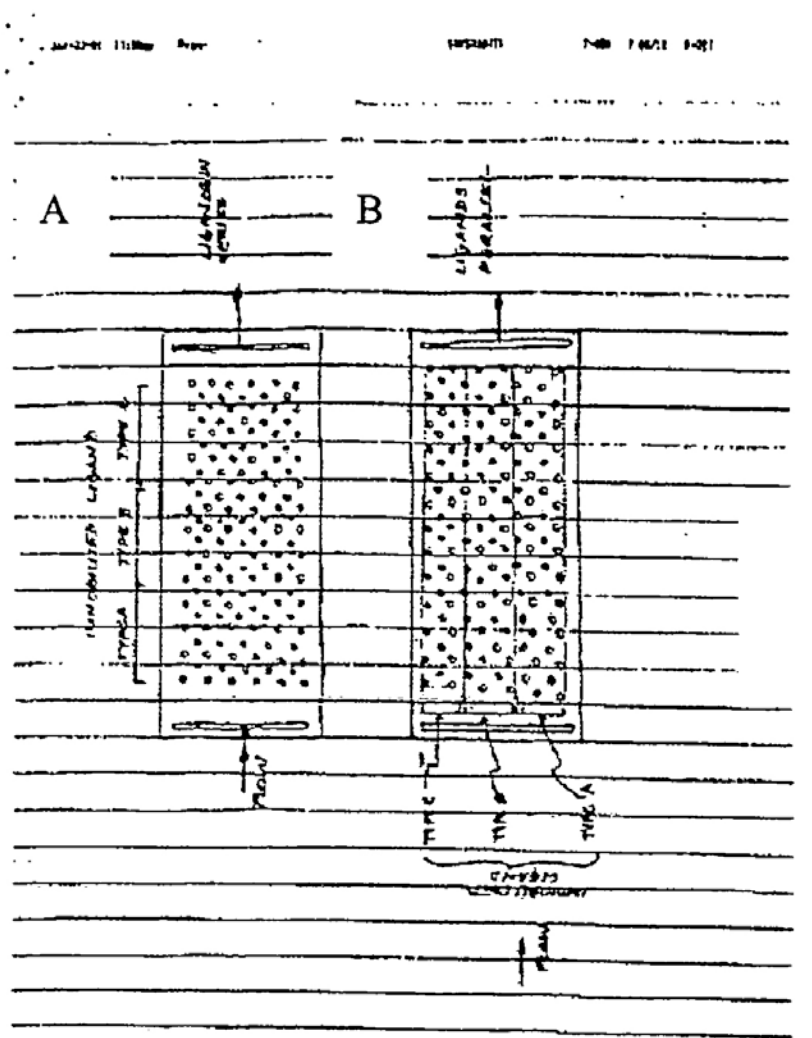


FIGURA 20

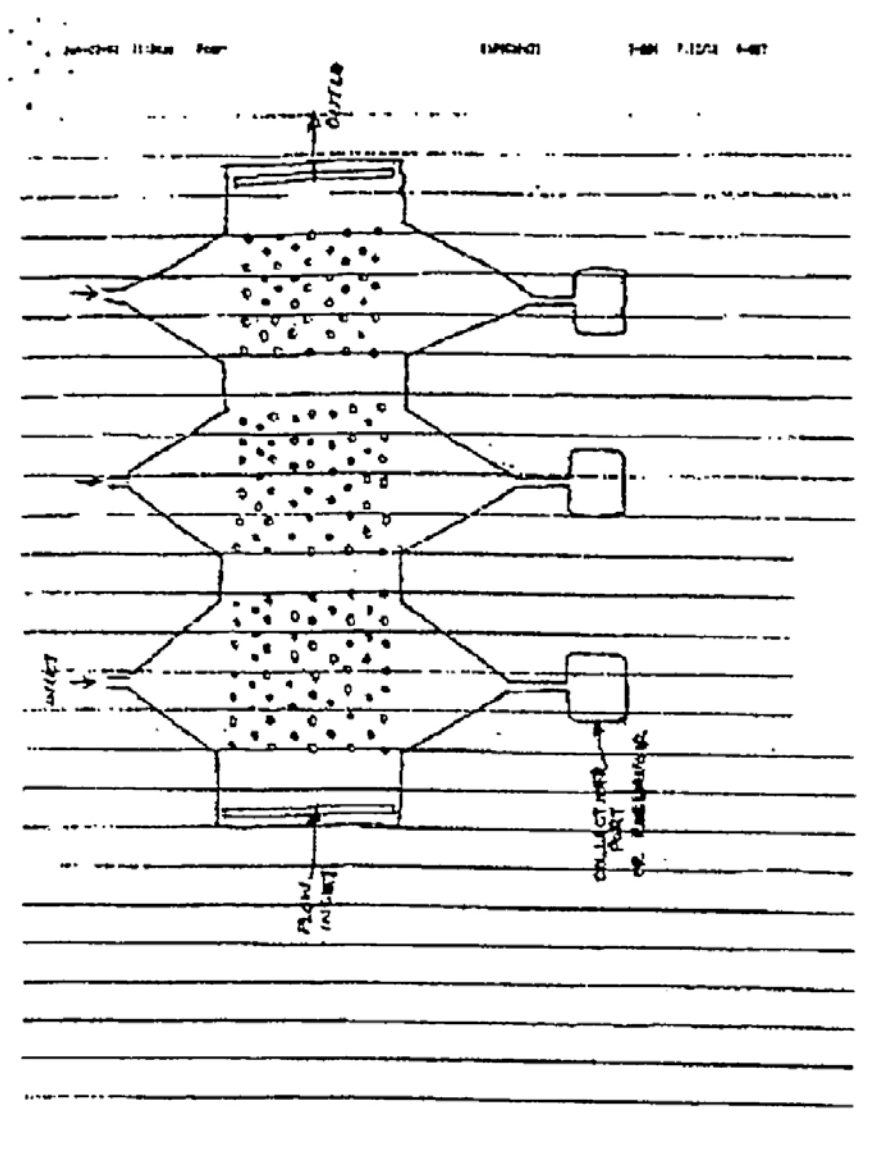


FIGURA 21



FIG. 22A

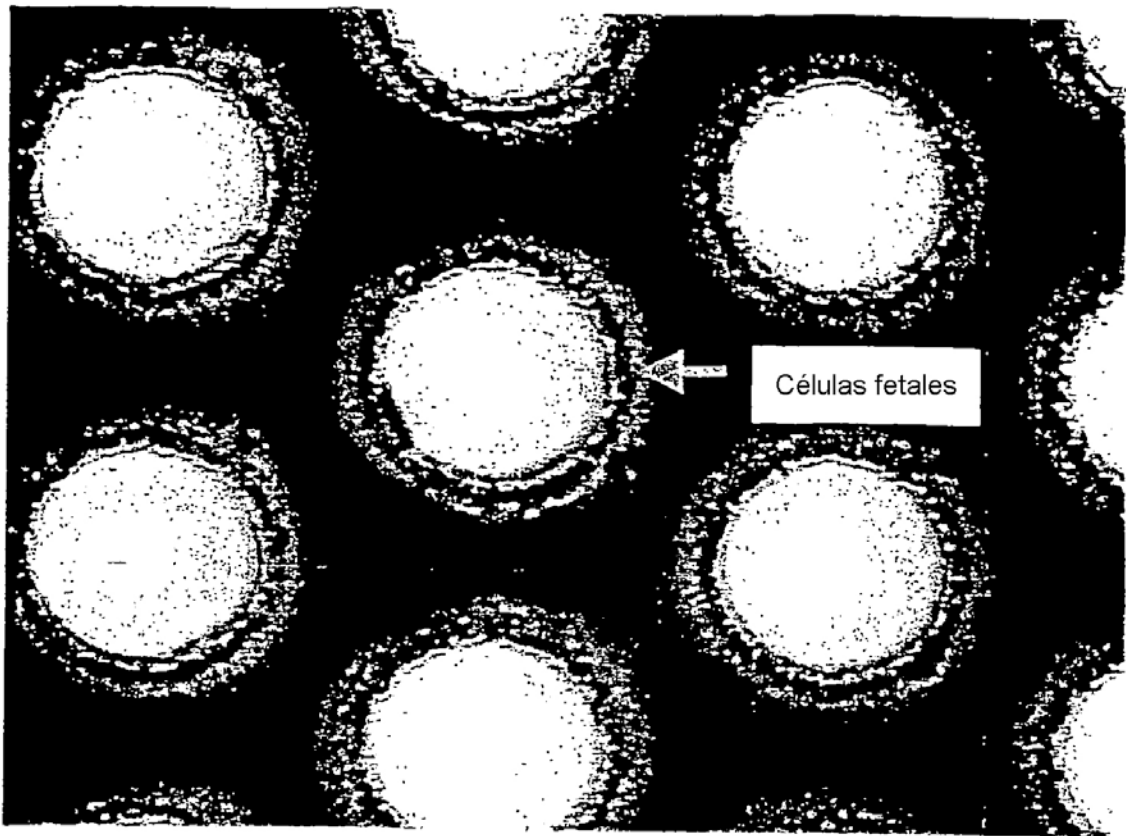


FIG. 22B

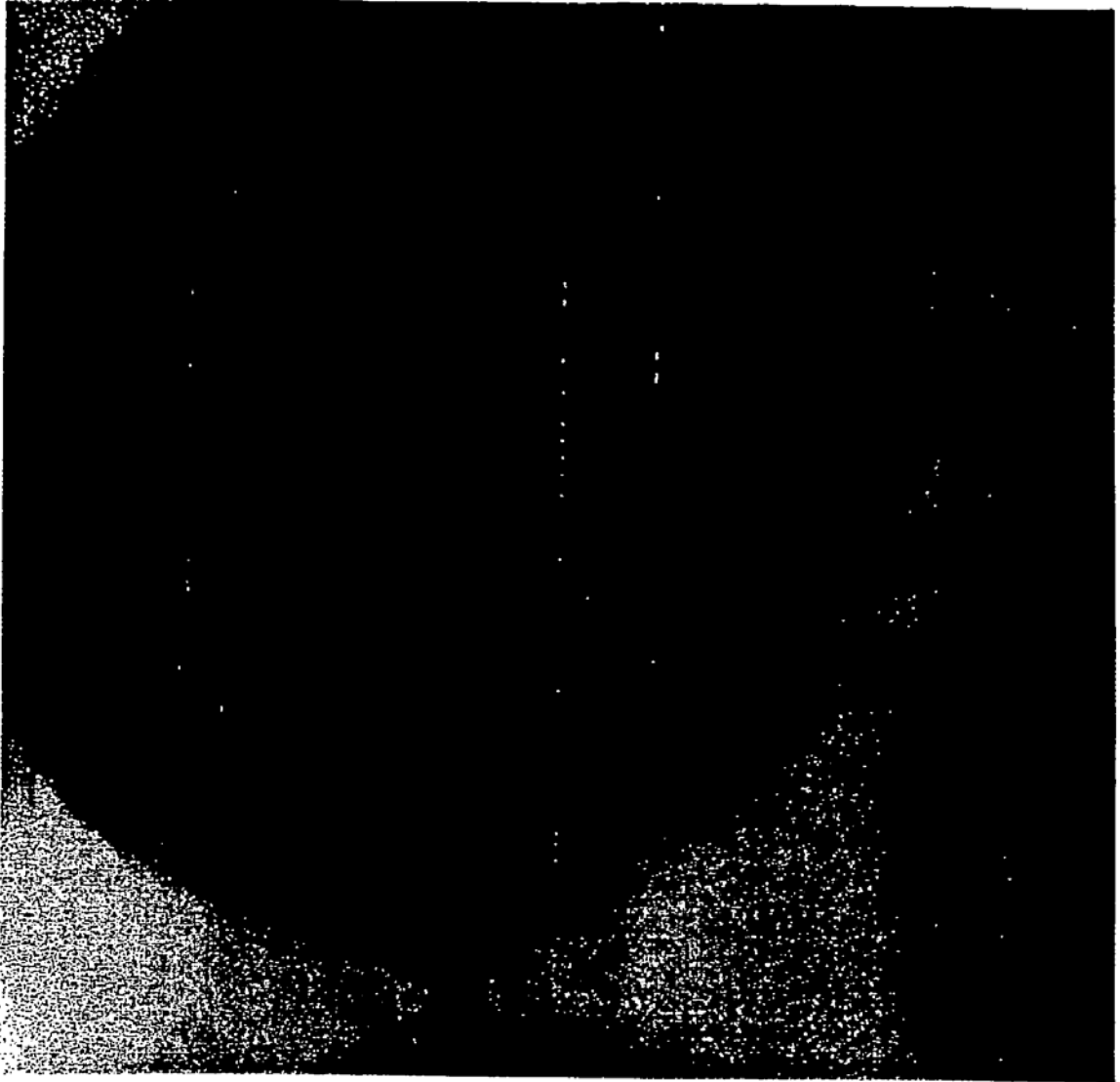
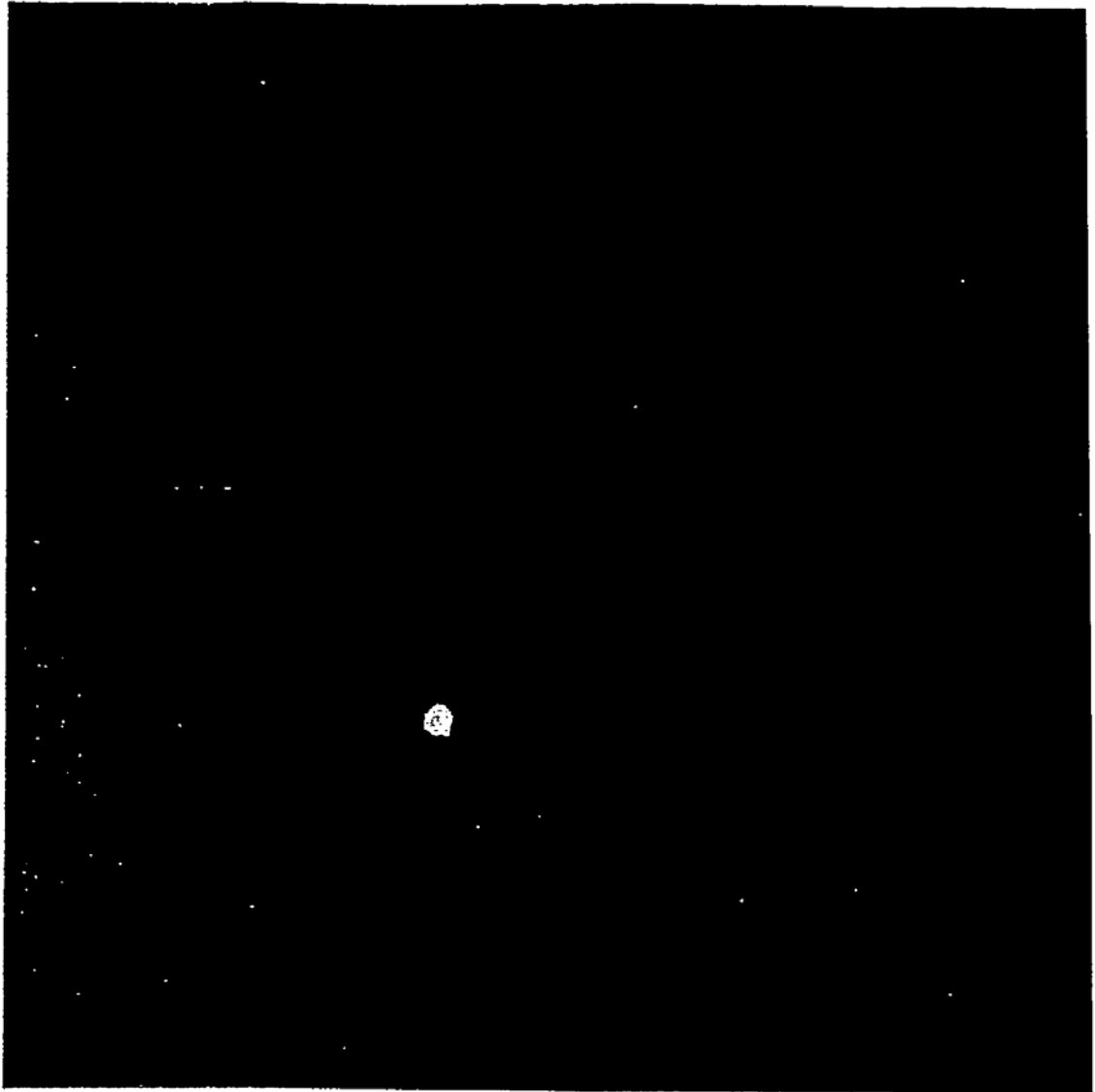


FIG. 22C



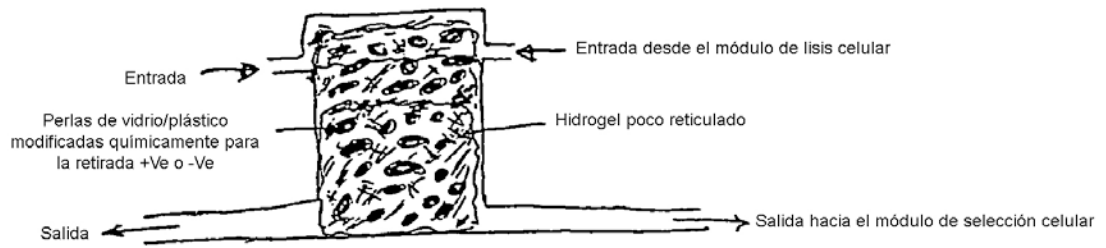


FIGURA 23

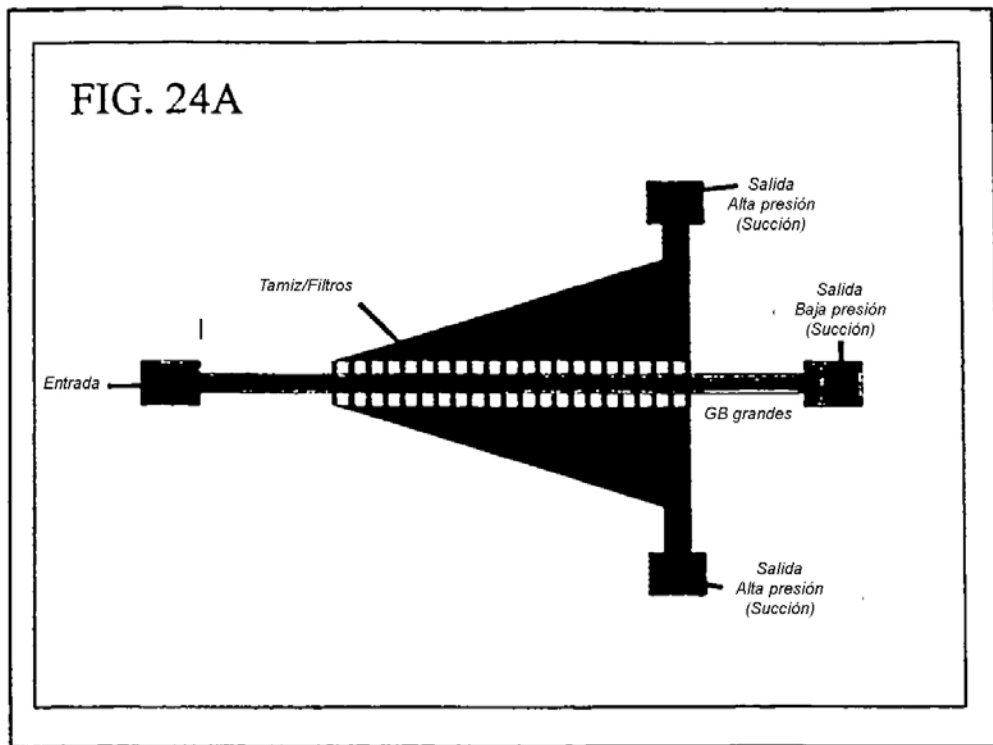


FIG. 24B

